

Université de Sherbrooke

Implication de la protéine MURC/Cavin4 dans la régulation du SOCE chez les cardiomyocytes

Par
Julien Malette
Programme de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Mars, 2019

Membres du jury d'évaluation
Mannix Auger-Messier, Ph. D., programme de pharmacologie
Guylain Boulay, Ph. D., programme de pharmacologie
Michel Grandbois, Ph. D., programme de pharmacologie
Caroline Saucier, Ph. D., programme de biologie cellulaire

© Julien Malette, 2019

SOMMAIRE

Implication de la protéine MURC/Cavin4 dans la régulation du *Store-Operated Calcium Entry* (SOCE) chez les cardiomyocytes

Par
Julien Malette
Programme de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Dans le cœur, le maintien de l'homéostasie du Ca^{2+} est crucial pour assurer le métabolisme des cardiomyocytes. Des mécanismes cellulaires tels le SOCE (*store-operated calcium entry*) permettent de réguler finement la concentration du Ca^{2+} dans ce type cellulaire. Un dérèglement du SOCE peut contribuer de manière importante à la pathophysiologie des cardiomyopathies. Il est donc pertinent d'étudier les mécanismes régulant cette voie d'entrée du Ca^{2+} . À cette fin, nous avons identifié par *GST-pulldowns* la protéine MURC/Cavin4 (*muscle-related coiled-coil protein*) comme étant un partenaire d'interaction de la protéine STIM1 (un senseur calcique et activateur du SOCE) dans le cœur et les cardiomyocytes. Nous avons démontré que le domaine HR1 de MURC lui est requis et que le domaine ERM de STIM1 est suffisant pour assurer leur interaction. Ensuite, Nous avons évalué l'impact potentiel de MURC sur le SOCE chez des cardiomyocytes isolés de rats nouveau-nés (NRVMs). Dans un premier temps, l'activité du SOCE a été validée dans ce type cellulaire par imagerie calcique au *Fura-2/AM*. Par la suite, nous avons démontré que la surexpression de MURC potentialise le SOCE dans les NRVMs et que son domaine HR1 est nécessaire pour médier ses effets. Ces entrées de Ca^{2+} sont spécifiques au SOCE puisqu'en présence d'inhibiteurs de ce mécanisme, le SKF-96365 et le 2-APB, ces entrées calciques ont été abolies. Nous avons ensuite investigué par quels mécanismes potentiels la surexpression de MURC potentialise le SOCE. MURC n'influence pas l'expression de STIM1 et de Orai1 (sélectif au Ca^{2+}) évaluées par immunobuvardage. Nous avons ensuite déterminé si la surexpression de MURC modulait les niveaux d'interaction entre STIM1 et Orai1 par coimmunoprécipitation. Nos résultats démontrent que MURC augmente cette interaction en condition basale et que celle-ci n'est pas significativement différente lorsque le SOCE est activé par la caféine et la thapsigargine. Nous avons également évalué l'impact de la mutation R140W sur la capacité de MURC à potentialiser le SOCE. À notre surprise, la surexpression du mutant MURC-R140W exacerbe les effets de MURC sur le SOCE des NRVMs. En somme, nous avons caractérisé MURC comme étant un nouveau partenaire cellulaire de STIM1 dans les cardiomyocytes qui participe à la régulation du SOCE. De plus, nous avons identifié un premier mécanisme potentiel par lequel la forme mutée de MURC (R140W) pourrait contribuer au développement de cardiomyopathies.

Mots clés : MURC, STIM1, Ca^{2+} , SOCE, cardiomyocytes

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	I
TABLE DES MATIÈRES	II
LISTE DES FIGURES	IV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	V
REMERCIEMENTS.....	VII
INTRODUCTION	1
Le Ca^{2+} DANS LE CŒUR ET LES CARDIOMYOCYTES	1
RÔLE CENTRAL DU Ca^{2+} DANS LE MÉCANISME DE CONTRACTION DES CARDIOMYOCYTES	1
RÉGULATION DE L'EXPRESSION GÉNIQUE MÉDIÉE PAR LE Ca^{2+}	3
MÉCANISMES DE RÉGULATION DE L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE CARDIAQUE CELLULAIRE.....	4
<i>Homéostasie calcique impliquée dans le couplage excitation-contraction (EC)</i>	5
<i>Le Receptor-Operated Calcium Entry (ROCE)</i>	7
<i>Le Store-Operated Calcium Entry (SOCE)</i>	8
LES COMPOSANTES DU SOCE.....	10
<i>Les protéines STIMs</i>	10
<i>Les canaux calciques Orais</i>	14
<i>Les canaux calciques TRPCs</i>	17
LES CAVÉOLES SONT DES CARREFOURS IMPORTANTS DE LA SIGNALISATION DU Ca^{2+}	17
MÉCANISME DE FORMATION DES CAVÉOLES	18
ÉMERGENCE DES CAVINS COMME PROTÉINES PARTICIPANTES À LA FORMATION DES CAVÉOLES	19
RÔLE DE LA PROTÉINE MURC/CAVIN4 DANS LE CŒUR ET LES CARDIOMYOCYTES	21
ÉTUDE DE LA VARIATION DU Ca^{2+} INTRACELLULAIRE EN TEMPS RÉEL	23
BUT DE L'ÉTUDE	25
ARTICLE 1.....	26
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	53
VALIDATION DE L'INTERACTION ENTRE STIM1 ET MURC.....	53
DOMAINES D'INTERACTION ENTRE STIM1 ET MURC	55
POTENTIALISATION DU SOCE DANS LES NRVMS MÉDIÉE PAR LA SUREXPRESSION DE MURC	57
MODULATEURS POSITIFS DU SOCE.....	62
<i>Le CIF et la $iPLA_2$</i>	62

<i>La CRACR2A</i>	63
<i>La NOX2</i>	63
<i>Les septins</i>	64
<i>La protéine SGK1</i>	64
<i>Les pompes SPCA</i>	65
<i>La protéine STIMATE</i>	65
<i>Cav1</i>	66
MODULATEURS NÉGATIFS DU SOCE.....	66
<i>La Calmoduline</i>	66
<i>La protéine Golli</i>	67
<i>La protéine POST</i>	68
<i>La protéine ORMDL3</i>	69
<i>SARAF</i>	69
<i>L'α-tubuline et les microtubules</i>	71
<i>La FLNA</i>	72
<i>La PKC</i>	72
<i>La PKG</i>	73
<i>La protéine STC2</i>	73
<i>La protéine STIM2</i>	74
SIGNALISATION DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE	74
IMPACT DE MURC SUR L'ACTIVITÉ DE L'ADCY6	77
CLARIFICATION DU RÔLE DE MURC DANS L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE DES CARDIOMYOCYTES	77
INTERACTOME DE MURC ET DE STIM1 DANS LES CARDIOMYOCYTES.....	78
IMPACT DES DOMAINES ET DES MUTATIONS DE MURC L'IMPLIQUANT DANS LES CMD	78
GÉNÉRATION DE CHIMÈRES DE MURC COMPRENANT LES DOMAINES HR1 DES AUTRES CAVINS	78
POTENTIALISATION DU SOCE PAR MURC VIA LE CANAL CALCIQUE ORa11	79
ÉVALUATION DE LA NÉCESSITÉ DE MURC DANS LA RÉGULATION DU SOCE CHEZ LES NRVM	79
LOCALISATION DES COMPOSANTES DU SOCE LORSQUE MURC EST SUREXPRIMÉ.....	79
CONCLUSION	80
LISTE DES RÉFÉRENCES	82

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Myofilaments constituant les sarcomères.....	2
Figure 2 : Mécanisme du Ca^{2+} -Induced Ca^{2+} Release (CICR) impliqué dans la contraction cellulaire des cardiomyocytes.....	5
Figure 3 : Mécanisme du <i>Store-Operated Ca^{2+} Entry</i> (SOCE) dans l'homéostasie calcique des cardiomyocytes.....	9
Figure 4 : Mécanisme d'activation de STIM1 menant à une entrée de Ca^{2+} du milieu extracellulaire.....	13
Figure 5 : Domaines et polymorphismes à nucléotide unique (SNP) connus de la protéine MURC.....	22
Figure 6 : Protocole d'imagerie calcique permettant d'évaluer le SOCE chez des cardiomyocytes.....	24
Article 1, Figure 1 : MURC interacts with the ERM domain of STIM1.....	37
Article 1, Figure 2 : The HR1 domain of MURC is required for its interaction with STIM1.....	38
Article 1, Figure 3 : MURC requires its HR1 domain to increase SOCE-mediated Ca^{2+} entry in NRVM.....	40
Article 1, Supplemental Figure 1 : MURC overexpression does not modulate Ca^{2+} release and reuptake from intracellular stores.....	41
Article 1, Figure 4 : MURC potentiates the STIM1 interaction with Orai1 in NRVM.....	42
Article 1, Figure 5 : The R140W missense variant of MURC potentiates the effect on SOCE-mediated Ca^{2+} entry in NRVM.....	44
Figure 7 : La protéine MURC interagit avec STIM1 et potentialise le SOCE dans les cardiomyocytes.....	81

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2-APB	2-aminoéthoxydiphényl borate
AA	Acide arachidonique
ADCY6	Adénylyl cyclase de type 6
ARC	Canaux calciques impliqués dans la signalisation de l'AA
BFA	<i>Brefeldin A</i>
Caff	<i>Caffeine</i>
CaM	Calmoduline
CaMK	<i>Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase</i>
Cav	Cavéoline
CC	Domaine <i>coiled-coil</i>
CDI	Inhibition dépendante du Ca ²⁺
CICR	<i>Ca²⁺-Induced Ca²⁺ Release</i>
CIF	<i>Ca²⁺ influx factor</i>
CMD	Cardiomyopathies dilatées
CRACR2A	<i>CRAC regulator 2A</i>
CSD	<i>Caveolin scaffolding domain</i>
DAG	Diacylglycérol
DR	<i>Low-homology disordered region</i>
EC	Excitation-contraction
EHD2	<i>Eps-15 homology domain 2</i>
ERM	<i>Ezrin/Radixin/Moesin domain</i>
ESyt-1	Synaptotagmin-1
FLNA	<i>Filamin A</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>
GST	<i>Glutathione-S-transferase</i>
HDAC	Histone déacétylase
HR	<i>Helical region</i>
I _{CRAC}	<i>Ca²⁺ release-activated currents</i>
ID	<i>Inhibitory Domain</i>
IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphate
IP3R	Récepteur à l'IP3
I _{soc}	<i>Store-Operated Ca²⁺ current</i>
L-VDCC	Canal calcique voltage-dépendent de type L
MBP	<i>Myelin basic proteins</i>
MCU	<i>Mitochondrial Ca²⁺ uniporter</i>
MEF2	<i>Myocyte Enhancer Factor-2</i>
MURC	<i>Muscle-related coiled-coil protein</i>
NCX	Échangeur à Na ⁺ /Ca ²⁺
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
NOX2	NADPH oxydase 2
NMT	N-myristoyltransférase
NRVM	<i>Neonatal rat ventricular myocyte</i>
ORMDL-3	<i>Orosomucoid-like 3 protein</i>
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C

PKG	Protéine kinase G
PLA	Phospholipase A
PLC β	Phospholipase C β
PMCA	<i>Plasma membrane Ca²⁺-ATPase</i>
POST	<i>Partner of STIM1</i>
PTRF	<i>Polymerase 1 release transcript</i>
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
ROCE	<i>Receptor-Operated Ca²⁺ Entry</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RS	Reticulum sarcoplasmique
RyR	Récepteur à la ryanodine
SAM	<i>Sterile α-motif</i>
SARAF	<i>SOCE-associated regulatory factor</i>
SERCA	<i>Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase</i>
SDPR	<i>Serum deprivation protein response</i>
SGK1	<i>Serum and glucocorticoid kinase 1</i>
SOAR	<i>STIM-Orai activating region</i>
SOCE	<i>Store-Operated Ca²⁺ Entry</i>
SPCA	<i>Secretory pathway Ca²⁺ ATPase</i>
SRBC	<i>Srd-related product that binds to c-kinase</i>
STC2	<i>Stanniocalcin 2</i>
STIM	<i>Stromal Interaction Molecule</i>
STIMATE	<i>STIM-activating enhancer</i>
TG	Thapsigargine
TPA	12-myristate-13-acétate
TRPC	<i>Transient Receptor Potential Canonical channels</i>
T-VDCC	Canal calcique voltage-dépendent de type T
VDCC	Canal calcique voltage-dépendent

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes directeurs de recherche, les Prs Mannix Auger-Messier et Guylain Boulay, de m'avoir permis d'effectuer ma maîtrise au sein de leur laboratoire de recherche. Je les remercie également pour leur appui tout au long de mes études graduées, le partage de connaissance et les conversations scientifiques qui m'ont permis de me développer en tant que professionnel en recherche scientifique.

Je tiens à remercier les membres du jury d'évaluation de mon mémoire, les Prs Michel Grandbois et Caroline Saucier pour avoir accepté et pris le temps d'évaluer mon mémoire.

Je tiens à remercier également nos collaborateurs avec qui nous avons soumis l'article, le Pr Jean-Luc Parent et Jade Degrandmaison pour leur expertise, leur bon moral et leur professionnalisme.

Je remercie les membres de mes laboratoires de recherche, Hugo Giguère, Jonathan Berthiaume, Audrey-Ann Dumont, Lauralyne Dumont, Gino Laberge et Vanessa De Carvalho Oliveira, Xavier Sainsilly, Jasmin Collerette et David Coquerelle d'une part pour les discussions de nature scientifique ou non, d'autre part pour avoir passé avec eux les hauts et les bas de mon parcours à la maîtrise.

INTRODUCTION

Le Ca^{2+} dans le cœur et les cardiomyocytes

Dans le cœur, le Ca^{2+} assure le bon fonctionnement de cet organe qui achemine de l'oxygène et des nutriments essentiels contenus dans le sang à l'organisme par des cycles successifs de contractions et de relaxations. Parmi les types cellulaires qui assurent l'intégrité de la fonction cardiaque, les cardiomyocytes sont ceux qui effectuent et maintiennent une contractilité efficace du cœur. Or, le Ca^{2+} joue plusieurs rôles cellulaires permettant de préserver l'intégrité fonctionnelle des cardiomyocytes. Son implication dans une multitude de processus cellulaires dépend grandement de son dynamisme cellulaire. Ses caractéristiques spatio-temporelles, sa capacité à réguler l'activité de plusieurs protéines ainsi que sa concentration dans les différents compartiments cellulaires tels le cytoplasme, le réticulum sarcoplasmique (RS), les mitochondries et le noyau caractérisent ce dynamisme cellulaire. La régulation fine de la concentration calcique cellulaire dicte quels sont les effets de cet ion dans les cardiomyocytes et le cœur (Aronsen *et al*, 2016).

Rôle central du Ca^{2+} dans le mécanisme de contraction des cardiomyocytes

La contraction cellulaire des cardiomyocytes se divise en deux phases : la diastole (état en relaxation) et la systole (état en contraction) (Solaro et Rarick, 1998). Lors de la diastole, la concentration cytoplasmique du Ca^{2+} se situe entre 80 nM et 100 nM ce qui limite l'activation des mécanismes requis pour amorcer la contraction cellulaire. Durant la systole, une augmentation de la concentration du Ca^{2+} dans le cytoplasme précède la contraction cellulaire des cardiomyocytes. Ces deux états se succèdent de manière continue pour ainsi former des cycles de contractions et de relaxations permettant au cœur de battre de manière efficace et pour transporter le sang oxygéné aux organes cibles du corps. Dans le cytoplasme, les sarcomères sont les composantes cellulaires responsables d'effectuer la contraction des cardiomyocytes. La structure des sarcomères est composée de plusieurs complexes protéiques organisés en deux types de myofilaments (Figure 1). Le premier type

est composé de dimères d'actines, de tropomyosine, de nébuline et d'un complexe hétérotrimérique de troponines (troponine C, troponine T et troponine I). Le deuxième type est composé de myosine et de tintine. La contraction et la relaxation cellulaire sont effectuées par l'interaction entre ces deux types de myofilaments (Koubassova et Tsaturyan, 2011).

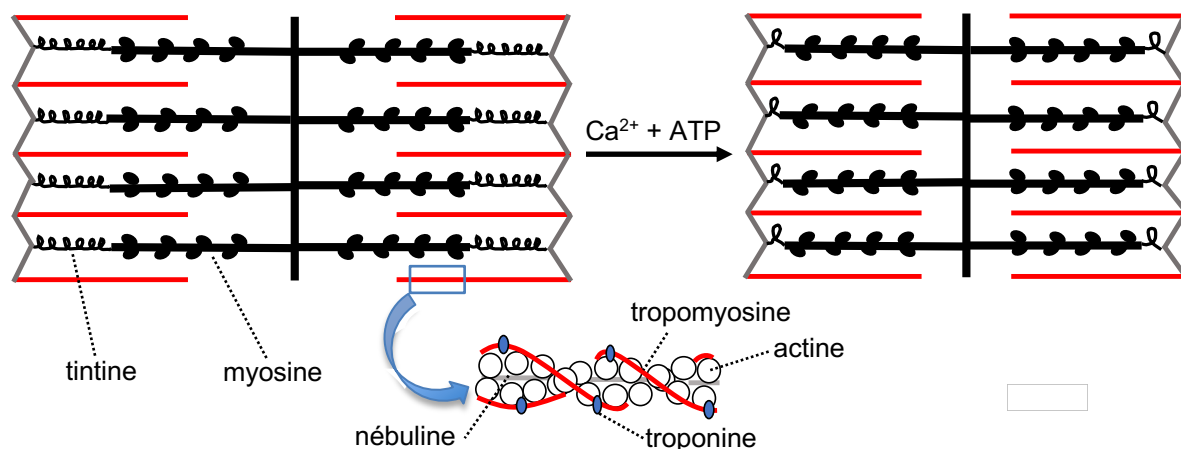


Figure 1 : Myofilaments constituant les sarcomères. Schéma représentant les unités contractiles des cardiomyocytes (sarcomères) et les principales protéines retrouvées au sein de ces organelles. L'organisation tridimensionnelle des composantes identifiées donne un aperçu partiel du fonctionnement des sarcomères durant la diastole (à gauche) et la systole (à droite).

En diastole, la troponine I interagit avec l'actine et stabilise le complexe protéique d'actine, de tropomyosine et de troponine T. Dans cette conformation, la myosine n'interagit pas avec l'actine en raison de l'encombrement créé par le complexe protéique ce qui prévient le déclenchement d'une contraction cellulaire. À titre de second messager, le Ca^{2+} joue un rôle important dans l'initiation de la contraction cellulaire des cardiomyocytes. En début de systole, le déclenchement du mécanisme du Ca^{2+} -Induced Ca^{2+} release (CICR) (mécanisme qui est décrit plus loin dans le présent document) par le potentiel d'action provoque une relâche de Ca^{2+} importante dans le cytoplasme provenant du RS, un réservoir intracellulaire de Ca^{2+} . L'augmentation de la concentration du Ca^{2+} dans le cytoplasme permet à cet ion d'interagir avec les domaines *EF-hand* de la troponine C au niveau des sarcomères. La liaison du Ca^{2+} à la troponine C induit un changement conformationnel de celle-ci qui augmente son affinité pour la troponine I et favorise leur interaction. Cette interaction induit un changement conformationnel de la troponine I qui diminue son affinité pour l'actine et prévient ainsi leur interaction. La perte d'interaction entre la troponine I et l'actine induit un déplacement de la tropomyosine liée à l'actine. Ce

déplacement de la tropomyosine libère les sites de liaison de la myosine sur l'actine. De manière ATP-dépendante, la myosine interagit avec l'actine et amorce la contraction cellulaire.

Lorsqu'une baisse de la concentration du Ca^{2+} cytoplasmique s'effectue en diastole, la probabilité d'interaction entre le Ca^{2+} et la troponine C est moins importante. Cette perte d'interaction engendre un changement conformationnel de la troponine C diminuant son affinité pour la troponine I. L'abolition de cette interaction permet à la troponine I d'interagir à nouveau avec l'actine. Cette liaison interfère avec celle entre l'actine et la myosine et termine la contraction cellulaire. L'interaction entre l'actine et la myosine est ainsi prévenue jusqu'à la prochaine relâche de Ca^{2+} du RS lors d'une systole subséquente. En interagissant avec la troponine C, le Ca^{2+} joue un rôle central dans le mécanisme menant à la contraction (systole) et la relaxation (diastole) cellulaires des cardiomyocytes.

Régulation de l'expression génique médiée par le Ca^{2+}

Le Ca^{2+} est également impliqué dans l'homéostasie des cardiomyocytes en participant à la régulation de l'expression génique de plusieurs protéines. En modulant l'activité de plusieurs facteurs de transcription, le Ca^{2+} participe à une panoplie de processus cellulaires telles la différenciation, la prolifération, la mort cellulaire le métabolisme et l'hypertrophie cardiaque (Chiong *et al*, 2010; Janowski *et al*, 2010). Le Ca^{2+} contribue, entre autres, à deux mécanismes de régulation de la transcription chez les cardiomyocytes.

Un de ces mécanismes est relié au rôle transcriptionnel de la *Ca^{2+} -calmodulin-dependant kinase* (CaMK) sur les histones déacétylases (HDAC) de classe II. Les HDAC induisent une répression de l'expression génique en effectuant une déacétylation des histones ce qui provoque une condensation de la chromatine. Sous la forme condensée, les régions promotrices de la chromatine ne sont plus accessibles aux facteurs de transcription ce qui inhibe l'expression de gènes cibles. Les HDAC sont également impliquées dans la régulation de l'activation du facteur de transcription *Myocyte Enhancer Factor-2* (MEF2) qui participe au développement hypertrophique des cardiomyocytes. Les HDAC de

classe II sont parmi les substrats de la CaMK qui les phosphoryle au niveau du noyau. Une phosphorylation des HDAC provoque leur dissociation de MEF2 et favorise leur exportation du noyau vers le cytoplasme. Dans ce contexte, la quantité de HDAC située au noyau est réduite ce qui diminue la répression de l'expression génique associée à leur activité (Lu *et al*, 2000; McKinsey *et al*, 2001). Or, l'activation de la CaMK est dépendante du Ca^{2+} . Les concentrations du Ca^{2+} dans le noyau et dans le cytosol influenceront directement l'activité et la translocation nucléaire de la CaMK ce qui permet à cet ion de réguler de manière importante la transcription génique chez les cardiomyocytes.

La régulation de l'activité du facteur de transcription *Nuclear Factor of Activated T-cells* (NFAT) par la sérine-thréonine phosphatase calcineurine constitue un autre mécanisme régulant de manière importante l'activité transcriptionnelle chez les cardiomyocytes. En condition basale, NFAT se retrouve dans le cytoplasme où il est sous une forme phosphorylée. Dans cet état, NFAT interagit avec la protéine rétentric 14-3-3 ce qui prévient sa translocation au noyau où il induit l'expression de ses gènes cibles. Or, NFAT est l'une des cibles de la calcineurine qui déphosphoryle ce facteur de transcription par son activité phosphatase. La déphosphorylation de NFAT provoque une perte d'interaction avec la protéine rétentric 14-3-3 et permet la relocalisation de NFAT au noyau où il se lie à l'ADN pour activer la transcription de gènes cibles (Molkentin *et al*, 1998). Puisque l'activité de la calcineurine est dépendante du Ca^{2+} , une élévation soutenue dans le temps de la concentration en Ca^{2+} dans le cytoplasme influencera directement la capacité de NFAT à se relocaliser au noyau pour induire l'expression génique.

Bien qu'il agisse à plusieurs autres niveaux, ces exemples indiquent comment le Ca^{2+} joue un rôle central dans l'homéostasie cellulaire des cardiomyocytes en participant à une grande variété de mécanismes cellulaires qui maintiennent l'intégrité et la fonctionnalité de ce type cellulaire.

Mécanismes de régulation de l'homéostasie calcique cardiaque cellulaire

Le maintien de l'homéostasie dynamique du Ca^{2+} dans le cœur et les cardiomyocytes est essentiel afin d'assurer leurs fonctions. Les variations de la

concentration intracellulaire du Ca^{2+} influencent directement les processus cellulaires des cardiomyocytes. Une dérégulation de cette homéostasie peut être délétère et contribuer au développement de cardiomyopathies. La compréhension des mécanismes du mouvement calcique à travers les différents compartiments cellulaires et leur régulation est donc essentielle afin d'identifier leurs impacts dans un cadre physiopathologique. Les prochaines sections discuteront des principaux mécanismes de régulation de l'homéostasie du Ca^{2+} dans les cardiomyocytes en portant une attention particulière sur le mécanisme d'entrée capacitative du Ca^{2+} ou *Store-Operated Calcium Entry* (SOCE).

Homéostasie calcique impliquée dans le couplage excitation-contraction (EC)

Le couplage EC est le mécanisme cellulaire par lequel les cellules musculaires squelettiques ou cardiaques produisent une contraction cellulaire synchronisée suivant un stimulus électrique, le potentiel d'action (Aronsen *et al*, 2016; Bers, 2002; Eisner *et al*, 2017). Ce couplage implique également une relaxation efficace de ces types cellulaires afin de maintenir l'efficacité des contractions subséquentes. Dans ce sens, un cycle de couplage EC consiste en une stimulation électrique, une contraction cellulaire et d'une relaxation. Dans le cœur, le couplage EC assure une contraction adéquate des cardiomyocytes et l'ion Ca^{2+} y joue un rôle central. En effet, la transmission du signal électrique en une contraction cellulaire est initiée par le mécanisme de CICR (Figure 2).

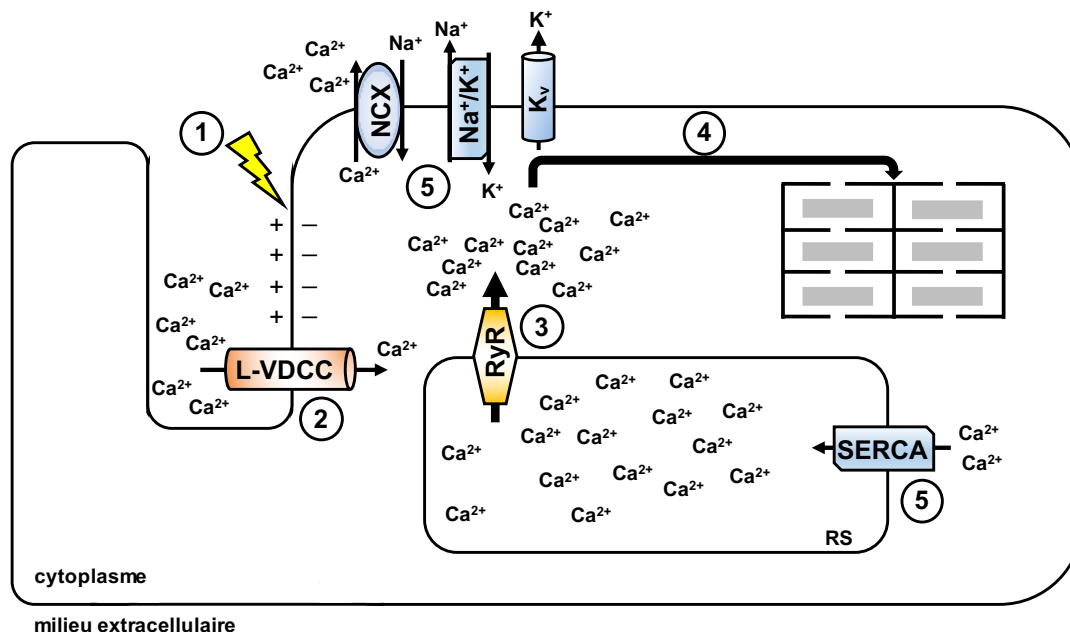


Figure 2 : Mécanisme du Ca^{2+} -Induced Ca^{2+} Release (CICR) impliqué dans la contraction cellulaire des cardiomyocytes. Schéma décrivant les étapes d'activation du CICR menant à la contraction cellulaire. **1.** L'arrivée du potentiel d'action à la membrane plasmique provoque une dépolarisation membranaire se propageant jusqu'aux tubules transverses. **2.** L'activation des canaux calciques voltage-dépendant de type L (L-VDCC) par la dépolarisation membranaire provoque une faible entrée de Ca^{2+} . **3.** L'entrée de Ca^{2+} provoque l'activation des récepteurs à la ryanodine (RyR) et déclenche une vidange de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (RS) vers le cytoplasme. **4.** La concentration du Ca^{2+} cytoplasmique est suffisamment élevée pour amorcer la contraction cellulaire au niveau des sarcomères. **5.** Plusieurs pompes et transporteurs à Ca^{2+} contribuent à rétablir les concentrations calciques cytoplasmiques à un niveau basal ce qui termine la contraction cellulaire. La *sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase* (SERCA) et l'échangeur à Ca^{2+}/Na^{+} (NCX) sont les deux principales protéines assurant cette fonction.

Lorsqu'un signal électrique parvient à la membrane plasmique des cardiomyocytes, celui-ci provoque l'ouverture des canaux sodiques voltage-dépendants. Le transport d'ions à travers la membrane plasmique modifie le potentiel membranaire déclenchant une dépolarisation à la surface cellulaire. Cette dépolarisation membranaire se propage jusqu'à une région cellulaire précise appelée le tubule transverse. Cette région a comme particularité de former des microdomaines où les composantes de la membrane plasmique et celles du RS sont très rapprochées dans la cellule permettant ainsi une communication étroite entre les signaux extracellulaires et les réservoirs intracellulaires de Ca^{2+} . Le changement de polarité membranaire au niveau du tubule transverse induit l'activation des canaux calciques voltage-dépendants (VDCC). Il existe deux types de VDCC, les VDCC de type T (T-VDCC) et les VDCC de type L (L-VDCC). Chez les cardiomyocytes ventriculaires, le L-VDCC est le type qui est exprimé de manière prédominante. L'activation des L-VDCC provoque l'ouverture de ces canaux et engendre une faible entrée de Ca^{2+} dans le cytoplasme. Cette élévation restreinte de Ca^{2+} n'est toutefois pas suffisante pour induire une contraction cellulaire. Cependant, le Ca^{2+} se lie aux récepteurs à la ryanodine (RyR) ancrés à la membrane du RS à proximité des L-VDCC et provoque leur activation. L'activation des RyR induit une vidange de Ca^{2+} provenant du RS ce qui contribue à augmenter la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} jusqu'à 1 μM . À ce stade, la concentration du Ca^{2+} dans le cytoplasme est suffisamment élevée pour déclencher les mécanismes de contraction cellulaire par l'interaction entre le Ca^{2+} et la troponine C décrite précédemment (Bers, 2002).

Plusieurs pompes, échangeurs et canaux à Ca^{2+} sont impliqués dans le rétablissement de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} à un niveau basal afin de permettre la relaxation des cardiomyocytes. Le mécanisme principalement associé à ce

phénomène est celui à l'échangeur NCX, un échangeur à Na^+ et à Ca^{2+} . Il assure le transport du Ca^{2+} cytoplasmique vers le milieu extracellulaire durant la diastole en travaillant de concert avec la pompe Na^+/K^+ -ATPase et les canaux potassiques voltage-dépendants (Figure 2). La pompe *plasma membrane Ca^{2+} -ATPase* (PMCA) effectue aussi le transport du Ca^{2+} du cytoplasme vers le milieu extracellulaire, mais de manière moins importante. À la membrane mitochondriale, le canal *mitochondrial Ca^{2+} uniporter* (MCU) diffuse le Ca^{2+} du cytoplasme vers la lumière intramitochondriale. À la membrane du RS, la pompe *sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase* (SERCA) permet le remplissage de ce réservoir intracellulaire de Ca^{2+} . Le rôle cellulaire de la pompe SERCA dans le couplage EC est important puisqu'elle assure qu'une concentration en Ca^{2+} suffisante est présente dans le RS. De ce fait, les prochaines vidanges de Ca^{2+} du RS permettront d'induire des contractions cellulaires efficaces.

Le Receptor-Operated Calcium Entry (ROCE)

Le ROCE est un second mécanisme de régulation de l'homéostasie du Ca^{2+} dans les cardiomyocytes. Ce mécanisme implique une entrée de Ca^{2+} qui est observée suivant l'activation de récepteurs à la membrane plasmique. Une des familles de récepteurs où l'on étudie le ROCE est celle des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG), en particulier ceux couplés à la protéine G_q . Dans cette famille de RCPG, les récepteurs à l'endothéline-1 (ET_A et ET_B) et à l'angiotensine II (AT_1 et AT_2) sont parmi les plus étudiés dans le cœur et les cardiomyocytes (Dewenter *et al*, 2017). Cette cascade signalétique débute par la liaison d'un ligand à son récepteur situé à la membrane plasmique qui induit un changement conformationnel de celui-ci. À titre de *guanine nucleotide exchange factor* (GEF), le RCPG activé favorise l'échange du GDP pour du GTP sur la sous-unité α de la protéine G_q . L'association du GTP à la sous-unité α provoque un changement de conformation de celle-ci qui l'active. Sous sa forme active, son affinité pour les sous-unités $\beta\gamma$ diminue ce qui entraîne la dissociation du complexe hétérotrimérique lié au récepteur. La sous-unité α active interagit avec l'isoforme β de la phospholipase C ($\text{PLC}\beta$) et l'active à son tour. La $\text{PLC}\beta$ clive le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) ancré à la membrane plasmique et produit deux seconds messagers, soit l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) et le diacylglycérol (DAG) (Ma *et al*, 2017). L' IP_3 active son récepteur, l' IP_3R , situé

au RS à titre de second messenger et déclenche la diffusion du Ca^{2+} dans le cytoplasme où il interagit principalement avec la calmoduline. Plusieurs kinases et canaux calciques situés à la membrane plasmique seront ensuite activés. Le DAG active certains canaux calciques localisés à la membrane plasmique ainsi que la protéine kinase C (PKC). À son tour, la PKC phosphoryle plusieurs canaux calciques tels les TRPC ce qui modifie leur activité. Suivant l'activation des canaux calciques par les seconds messagers, ceux-ci s'ouvrent et permettent une entrée de Ca^{2+} provenant du milieu extracellulaire où il assurera plusieurs fonctions cellulaires à titre de second messenger.

Le Store-Operated Calcium Entry (SOCE)

Le SOCE est un troisième mécanisme de régulation de l'homéostasie du Ca^{2+} dans le cœur. Initialement décrits comme un mécanisme cellulaire important dans les cellules non excitables (Putney, 1986), de plus en plus d'évidences impliquent sa présence chez les cellules excitables tels les cardiomyocytes. Le SOCE est le mécanisme par lequel une vidange de Ca^{2+} du RS provoque une entrée de Ca^{2+} du milieu extracellulaire vers le cytoplasme (Figure 3). Lorsque la concentration de Ca^{2+} dans le RS diminue, la protéine *Stromal Interaction molecule 1* (STIM1), un senseur de Ca^{2+} ancré à la membrane du RS, détecte cette baisse et s'active suivant un changement conformationnel de celle-ci (Liou *et al*, 2007). L'activation de STIM1 provoque sa relocalisation à proximité de la membrane plasmique. STIM1 interagit avec les canaux calciques Orai et TRPC localisés à la membrane plasmique. STIM1 favorise l'activation de ces canaux calciques ce qui engendre une entrée de Ca^{2+} du milieu extracellulaire vers le cytoplasme. Au moment où la recapture de Ca^{2+} dans le RS s'effectue, l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} dans le RS provoque un changement de conformation de STIM1 qui ramène cette protéine à un état inactif. STIM1 se dissocie des composantes de la membrane plasmique et l'entrée de Ca^{2+} de type SOCE se termine. Chez les cardiomyocytes, il existe deux mécanismes principaux qui provoquent une relâche de Ca^{2+} du RS. Ces deux mécanismes s'amorcent par l'activation d'un récepteur-canal ancré à la membrane du RS suivant la liaison avec leur ligand. L'activation de ces récepteurs-canaux engendre leur ouverture et déclenche une relâche de Ca^{2+} du RS vers le cytoplasme. Le premier mécanisme est médié par l'activation des RyR suivant la liaison du Ca^{2+} lors du CICR. Le deuxième mécanisme est initié par

l'IP3R suivant son activation par l'IP3 lors du ROCE. Le SOCE peut être activé indépendamment du CICR et du ROCE, mais travaille de concert avec ces deux mécanismes de régulation de l'homéostasie calcique cellulaire.

Le SOCE est un mécanisme impliqué dans la régulation de l'homéostasie du Ca^{2+} cellulaire si importante pour une multitude de processus cellulaires. Parmi ces processus, le SOCE est impliqué dans la prolifération, le métabolisme cellulaire, la régulation de la perméabilité membranaire, la migration cellulaire, la sécrétion d'hormone et de cytokines et la transcription (Bhardwaj *et al*, 2016; Kraft, 2015; Miao *et al*, 2016; Wen *et al*, 2016; Xia *et al*, 2016). La compréhension de la régulation du SOCE dans divers types cellulaires est donc primordiale afin de clarifier son impact dans le développement de maladies tels les cancers, les néphropathies et les cardiomyopathies.

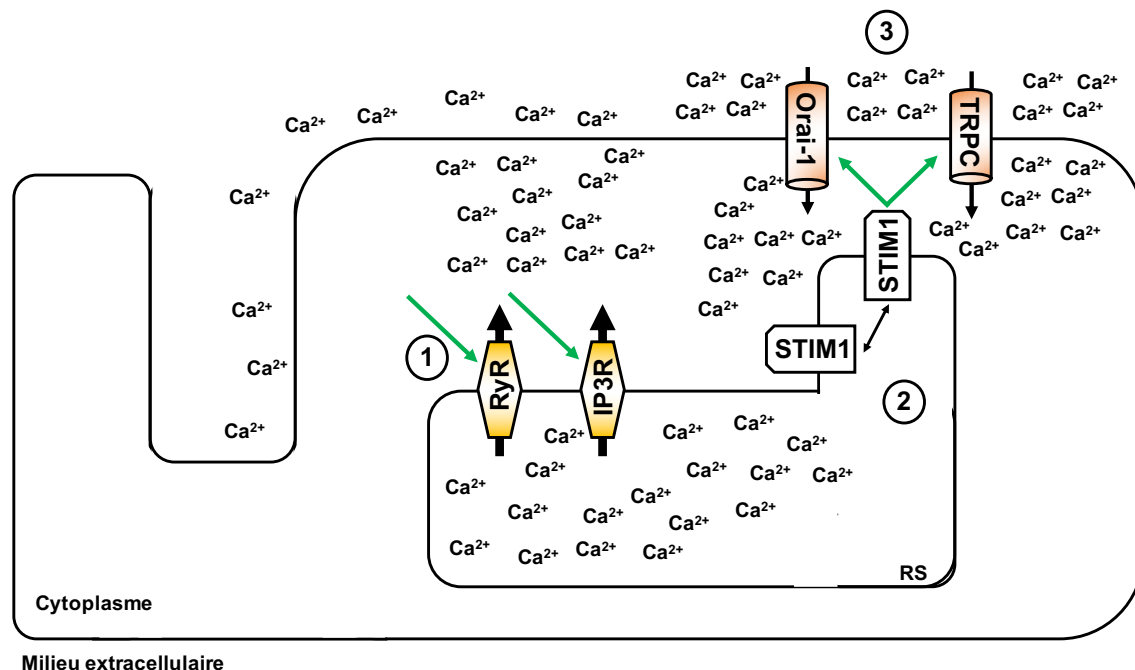


Figure 3 : Mécanisme du *Store-Operated Ca^{2+} Entry* (SOCE) dans l'homéostasie calcique des cardiomyocytes.

Schéma décrivant le mécanisme d'activation du SOCE impliqué dans l'homéostasie calcique des cardiomyocytes. 1. Suivant à l'activation des récepteurs-canaux tels les récepteurs à la ryanodine (RyR) et les récepteurs à l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3R), une vidange de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (RS) vers le cytoplasme est induite. 2. La diminution de la concentration du Ca^{2+} dans le RS est détectée par le capteur de Ca^{2+} *stromal interaction molecule 1* (STIM1) et provoque son activation. Un changement conformationnel de STIM1 suivant son activation mène à sa relocalisation près de la membrane plasmique. 3. STIM1 favorise l'activation des canaux calciques tels Orai1 et les TRPC ce qui engendre une entrée de Ca^{2+} du milieu extracellulaire vers le cytoplasme.

Chez les cardiomyocytes, le SOCE est un mécanisme prédominant au stade néonatal et s'estompe au stade adulte (Luo *et al*, 2012). Dans le cœur, le SOCE participe à plusieurs processus cellulaires tels la contractilité cellulaire, la signalisation des glucocorticoïdes, le métabolisme des espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'apoptose cellulaire et plusieurs autres (Kirschmer *et al*, 2016; Kitajima *et al*, 2016; Parks *et al*, 2016; Sabourin *et al*, 2016). Le bon fonctionnement du SOCE est donc primordial chez les cardiomyocytes pour assurer leurs fonctions. Or, dans un cadre pathologique, une augmentation de la prévalence et de l'amplitude de l'entrée de Ca^{2+} de type SOCE a été décrite (Hulot *et al*, 2011; Luo *et al*, 2012). Ces observations ont été associées à une augmentation de l'expression des composantes du SOCE ainsi qu'aux effets délétères d'une surcharge de Ca^{2+} au niveau cellulaire et cardiaque. Un dérèglement du SOCE a été impliqué dans le développement de fibrose, d'hypertension, de remodelage cardiaque, de myopathies avec des agrégats tubulaires et d'hypertrophie cardiaque (Endo *et al*, 2015; Ji *et al*, 2017; Kassan *et al*, 2016; Makarewich *et al*, 2014; Nesin *et al*, 2014; Ross *et al*, 2017; Saliba *et al*, 2015; Seo *et al*, 2014; Zhang *et al*, 2016). Il est donc important de mieux comprendre les mécanismes de régulation du SOCE, leurs dérèglements et leurs contributions dans le développement de cardiomyopathies.

Les composantes du SOCE

Les protéines STIM

STIM1

Structure et domaines fonctionnels de STIM1

STIM1 est une protéine de 685 acides aminés qui comporte un seul domaine transmembranaire permettant de l'ancrer à la membrane du RS. Les différents domaines fonctionnels de STIM1 se séparent en trois régions distinctes : la région luminale située à l'intérieur du RS (acides aminés 1 à 213), la région transmembranaire (acides aminés 214 à 234) et la région cytoplasmique (acides aminés 235 à 685) (Article 1 Figure 1A). La

portion N-terminale de STIM1 se retrouve dans le RS et la portion C-terminale se retrouve au niveau du cytosol. Dans la région luminale, les 22 premiers acides aminés correspondent au peptide signal. STIM1 possède également des domaines *EF-hands* (acides aminés 63 à 128), lui permettant de lier le Ca^{2+} et de détecter les variations Ca^{2+} dans le RS, ainsi qu'un domaine *sterile α -motif* (SAM) (acides aminés 132 à 200) (Bhardwaj *et al*, 2016). La région cytoplasmique comporte trois domaines *coiled-coil* nommés CC1 (acides aminés 238 à 343), CC2 (acides aminés 363 à 389) et CC3 (acides aminés 399 à 423). Ces domaines sont impliqués dans l'activation des canaux calciques ciblés par STIM1 et dans les interactions moléculaires entre STIM1 et ses protéines cibles (Soboloff *et al*, 2012). De plus, la portion cytosolique de STIM1 possède un domaine nommé *STIM-Orai activating region* (SOAR) (acides aminés 344 à 442) qui contient quatre hélices α . Le SOAR correspond à la plus petite séquence en acides aminés identifiée et requise pour activer le canal calcique Orai1 (Yuan *et al*, 2009). En aval du domaine SOAR, STIM1 possède un domaine qui assure l'inhibition et la fermeture du canal Orai nommé *inhibitory domain* (ID) (acides aminés 470 à 491). Il existe également un domaine nommé *Ezrin/Radixin/Moesin* (ERM) (acides aminés 219 à 548) qui englobe les domaines CC, SOAR et ID. L'étude du domaine ERM de STIM1 permet d'évaluer l'impact fonctionnel de ces domaines dans un contexte de régulation de l'entrée capacitative de Ca^{2+} chez les cellules. La portion cytoplasmique de STIM1 possède également deux domaines lui permettant d'interagir avec les phospholipides de la membrane plasmique. Le premier de ces domaines est riche en proline et sérine (PS) (acides aminés 600 à 629) et le second est riche en lysine (K) (acides aminés 671 à 685).

Dans les cardiomyocytes, une autre isoforme de la protéine STIM1 nommée STIM1L est exprimée. STIM1L est composé de 791 résidus et est exprimée par épissage alternatif par une insertion du onzième exon dans sa séquence protéique (Darbellay *et al*, 2011). STIM1L possède les mêmes composantes structurales que STIM1 en plus de détenir un domaine lui permettant d'interagir avec l'actine nommé *actin binding domain* (acides aminés 515 à 620). Cette isoforme de STIM1 maintient les caractéristiques fonctionnelles de cette protéine. Toutefois, en interagissant avec l'actine, STIM1L forme des microdomaines à proximité de la membrane plasmique contenant le canal calcique Orai1 de manière constitutive. Par ces observations, il a été suggéré que STIM1L est impliqué

davantage dans l'activité constitutive du SOCE comparativement à STIM1 (Darbellay *et al*, 2011).

Dynamisme moléculaire de STIM1 dans le SOCE

La protéine STIM1 est à la fois impliquée dans l'activation et la terminaison de l'entrée calcique de type SOCE. À travers ses étapes d'activation et d'inactivation, STIM1 subit différents changements conformationnels lui permettant de réguler de manière efficace le SOCE (Figure 4). En condition basale, où les réservoirs intracellulaires de Ca^{2+} sont remplis, STIM1 se retrouve sous une forme monomérique. Dans cet état, le Ca^{2+} est lié aux domaines *EF-hands* de STIM1. De plus, le domaine SAM stabilise la conformation monomérique inactive de STIM1 en interagissant avec les domaines *EF-hands* (Baba *et al*, 2006). De cette manière, le domaine SAM de STIM1 permet de prévenir une activation spontanée du SOCE en absence de vidange de Ca^{2+} du RS. Lors de l'activation du SOCE, la baisse de la concentration du Ca^{2+} dans le RS suivant l'activation des RyR et des IP3R réduit la probabilité d'interaction entre STIM1 et le Ca^{2+} ce qui engendre un changement conformationnel de STIM1. Ensuite, des interactions intramoléculaires surviennent et favorisent la dimérisation de STIM1 (Liou *et al*, 2007). À cette étape dans l'activation du SOCE, la formation de dimères de STIM1 provoque un second changement conformationnel de cette protéine menant à une extension de sa région cytoplasmique. Puisque STIM1 se situe près des jonctions membranaires entre le RS et la membrane plasmique chez les cardiomyocytes, les domaines PS et K permettent à STIM1 d'interagir avec les phospholipides de la membrane plasmique. À ce moment, STIM1 catalyse l'activation du SOCE en favorisant l'ouverture des canaux calciques Orai1, Orai3, TRPC1, TRPC3, TRPC4 et TRPC6 (Gwack *et al*, 2007; Huang *et al*, 2006; Luik *et al*, 2006; Nakayama *et al*, 2006; Saliba *et al*, 2015; Wu *et al*, 2010).

L'entrée de Ca^{2+} effectuée par ces canaux calciques amorce leur inactivation par un mécanisme d'inhibition qui est dépendante du Ca^{2+} (CDI). De plus, le domaine ID de STIM1 ainsi que la calmoduline (CaM) sont impliqués dans ce mécanisme d'inhibition des canaux calciques (Derler *et al*, 2009; Mullins *et al*, 2009). En parallèle, la pompe SERCA assure la recapture du Ca^{2+} dans les réservoirs intracellulaires en transportant le Ca^{2+} du

cytoplasme vers le RS. L'augmentation de la concentration du Ca^{2+} dans le RS accroît la probabilité d'interaction de cet ion avec les domaines *EF-hands* de STIM1. Lorsque l'interaction entre ces deux composantes est rétablie, le retour de STIM1 dans une conformation monomérique inactive est favorisé et contribue à l'inactivation du SOCE.

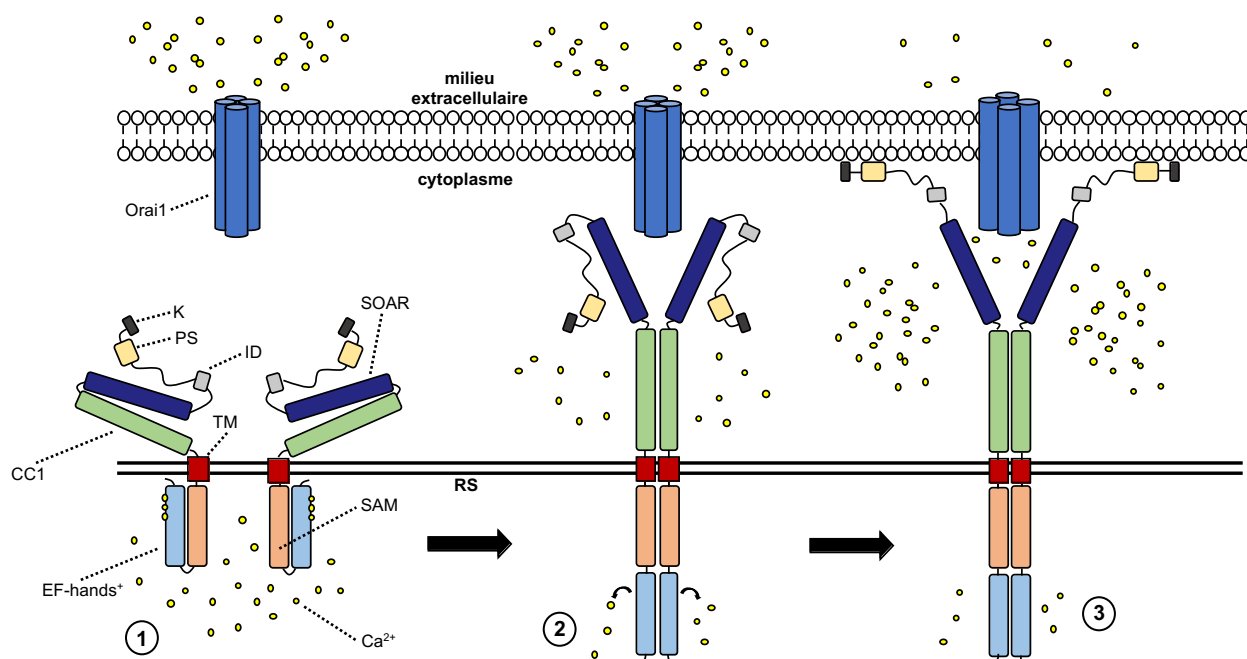


Figure 4 : Mécanisme d'activation de STIM1 menant à une entrée de Ca^{2+} du milieu extracellulaire.

Schéma décrivant le mécanisme d'activation de la protéine STIM1 suivant une relâche de Ca^{2+} provenant du réticulum sarcoplasmique (RS). 1. Lorsque la concentration du Ca^{2+} est élevée dans le RS, cet ion interagit avec les domaines *EF-hands* de STIM1 ce qui maintient cette protéine dans un état replié monomérique. 2. La diminution de la concentration du Ca^{2+} dans le RS suivant une relâche calcique induit un changement conformationnel de STIM1 qui favorise la dimérisation de celui-ci. 3. La dimérisation de STIM1 favorise l'extension de sa portion cytoplasmique et l'interaction de ses domaines riches en lysines (K) et en proline et sérine (PS) avec les phospholipides de la membrane cytoplasmique. Sous sa conformation active, STIM1 interagit avec les canaux calciques tels Orai1 et provoque leur ouverture ce qui engendre une entrée de Ca^{2+} du milieu extracellulaire.

Dans les dernières années, de nouveaux partenaires d'interaction de STIM1 ont été identifiés. Notre laboratoire ainsi que d'autres groupes de recherche ont démontré l'interaction de STIM1 avec ces nouveaux partenaires tels le T-VDCC $\text{Ca}_v3.1$ et le L-VDCC $\text{Ca}_v2.1$. Ces études suggèrent que STIM1 assure d'autres fonctions cellulaires calciques qui sont indépendantes du SOCE, notamment reliées au routage cellulaire de plusieurs protéines (Nguyen *et al*, 2013; Park *et al*, 2010; Wang *et al*, 2010). La recherche de nouveaux partenaires d'interaction de STIM1 serait bénéfique afin de mieux comprendre son rôle cellulaire et sa contribution dans le développement de pathologies cardiaques.

La protéine STIM2

STIM2 est le deuxième membre de la famille des protéines STIM et elle est également exprimée dans le cœur (Darbellay *et al*, 2010). D'un point de vue structurel, STIM2 est constituée des mêmes domaines que STIM1. De plus, les domaines *EF-hands* de STIM2 possèdent une affinité pour le Ca^{2+} qui est plus faible (K_D d'environ $400\mu\text{M}$) que celle des domaines *EF-hands* de STIM1 (K_D d'environ $200\mu\text{M}$). Cette propriété des domaines *EF-hands* de STIM2 augmente la probabilité d'activation de cette protéine et lui confère une activité constitutive en condition basale (Zheng *et al*, 2008). À ce titre, il a été suggéré que STIM2 agit comme un régulateur stabilisant la concentration du Ca^{2+} dans les réservoirs intracellulaires (Brandman *et al*, 2007). STIM2 est également apte à activer les canaux calciques situés à la membrane plasmique. De plus, plusieurs études indiquent que STIM2 peut assurer un rôle de régulateur négatif du SOCE en formant des hétérodimères avec STIM1 (Soboloff *et al*, 2006). Ces interactions entre STIM2 et STIM1 empêcheraient l'élongation de la région C-terminale de STIM1 près de la membrane plasmique où elle interagirait et les canaux calciques du SOCE. De cette manière, la relation établie entre les fonctions cellulaires de STIM1 et STIM2 assure une régulation efficace de l'entrée calcique de type SOCE dans plusieurs types cellulaires.

Les canaux calciques Orai

Le canal Orai1

Orai1 constitue le principal canal calcique impliqué dans le SOCE. C'est une protéine qui est exprimée de manière ubiquitaire et qui est localisée à la membrane plasmique. Dans la majorité des types cellulaires, l'expression d'Orai1 est supérieure à celle des autres membres de cette famille de canaux calciques. Ce canal calcique possède quatre domaines transmembranaires et ses extrémités N- et C-terminales se retrouvent dans le cytoplasme. L'ouverture de ce canal suivant son activation produit une entrée de Ca^{2+} qui est spécifique au SOCE, tout comme l'entrée calcique médiée par les canaux Orai2 et Orai3. Dans le domaine de l'électrophysiologie, le courant électrique généré par l'entrée de Ca^{2+} par les canaux Orai possède des propriétés uniques et se nomme *Ca^{2+} release-*

activated Ca²⁺ currents (I_{CRAC}) (Kawasaki *et al*, 2009). Orai1 s'organise en oligomère avant son exportation à la membrane plasmique pour former des canaux calciques fonctionnels. Orai1 peut s'organiser en homotétramères ou en homohexamères et peut également former des hétéromultimères avec les canaux calciques Orai2 et Orai3 (Bénard *et al*, 2016; Hou *et al*, 2012; Lis *et al*, 2007; Penna *et al*, 2008). L'activation de ces canaux est médiée par l'interaction entre les régions C-terminales de ces canaux et les domaines SOAR des protéines STIM1 et STIM2 (McNally *et al*, 2013; Park *et al*, 2009). La régulation de l'activité d'Orai1 est principalement accomplie par STIM1 étant donné que son domaine SOAR possède une plus grande affinité pour ce canal calcique que le domaine SOAR de STIM2. De plus, des études ont démontré qu'un ratio d'expression relative entre les protéines STIM1 et Orai1 était requis afin d'observer une entrée calcique optimale (Fahrner *et al*, 2014; Scrimgeour *et al*, 2009). Également, l'interaction entre STIM1 et Orai1 permet d'effectuer le recrutement coopératif du canal calcique TRPC1 à la membrane plasmique et de réguler son activité (Ambudkar *et al*, 2017; Jardin *et al*, 2008; Ong *et al*, 2007).

Il existe deux isoformes connues d'Orai1 nommées Orai1 α et Orai1 β . L'expression de ces isoformes dans divers organes, tissus et types cellulaires est équivalente (Fukushima *et al*, 2012). Orai1 β est exprimée à la suite d'une traduction alternative d'Orai1 α due à la présence d'un codon codant pour une méthionine en position 64 de sa séquence en acides aminés. L'initiation de la traduction s'effectue à un site différent de l'isoforme Orai1 α et mène à la production d'une forme réduite de la protéine Orai1 ayant un poids moléculaire d'environ 23 kDa au lieu de 33 kDa pour Orai1 α . Orai1 β ne possède pas un domaine riche en arginine lui permettant d'interagir avec les phosphoinositides de la membrane plasmique. Cette caractéristique d'Orai1 β augmente sa fluidité à travers la membrane plasmique comparativement à Orai1 α et accélère son recrutement par STIM1 lors de l'activation du SOCE.

Les canaux Orai2 et Orai3

Les protéines Orai2 et Orai3 complètent cette famille de canaux calciques. Tout comme Orai1, ils possèdent quatre domaines transmembranaires et peuvent être activés par

STIM1 et STIM2 (Parvez *et al*, 2008). L'expression de ces protéines est ubiquitaire (Gwack *et al*, 2007). Cependant, Orai2 est exprimé de manière prédominante dans le cerveau, les reins et les poumons (Wissenbach *et al*, 2007). De plus, deux isoformes du canal Orai2 nommées Orai2S et Orai2L peuvent être produites dans les cellules suivant un épissage alternatif. Les propriétés moléculaires de ces deux isoformes ne permettent pas de les distinguer dans un cadre fonctionnel (Gross *et al*, 2007). Dans le cœur, les protéines Orai1 et Orai3 sont les canaux calciques de cette famille qui sont exprimés de manière majoritaire (Saliba *et al*, 2015). De plus, les rôles cellulaires d'Orai2 dans les cardiomyocytes n'ont pas été décrits à ce jour. Les canaux Orai2 et Orai3 peuvent former des homomultimères possédant une sélectivité pour le Ca^{2+} comparable à celle des homomultimères d'Orai1 (Lis *et al*, 2007). Cependant, l'entrée de Ca^{2+} effectuée par les canaux Orai2 et Orai3 suivant l'activation du SOCE est moins soutenue qu'une entrée de Ca^{2+} médiée par le canal Orai1 (Lis *et al*, 2007; Mercer *et al*, 2006). Il a été suggéré que cette variation d'entrée calcique observée entre les différents canaux Orai est associée à leurs mécanismes d'inactivation suivant l'activation du SOCE. De plus, les canaux Orai peuvent former des hétéromultimères qui possèdent des propriétés moléculaires distinctes des canaux Orai homomultimériques (Zhang *et al*, 2008). Par exemple, des hétérotétramères constitués des canaux Orai1 et Orai3 possédant une sélectivité moindre pour le Ca^{2+} comparativement aux formes homomultimériques peuvent être formés (Schindl *et al*, 2009). De plus, Orai1 et Orai3 peuvent former des hétéropentamères dont leur régulation est indépendante des réservoirs intracellulaires de Ca^{2+} et qui sont associés à la signalisation calcique de l'acide arachidonique (Mignen *et al*, 2009; Thompson et Shuttleworth, 2012). Une caractéristique fonctionnelle du canal Orai3 qui le distingue des canaux Orai1 et Orai2 est sa régulation par le 2-aminoéthoxydiphényl borate (2-APB) qui est un inhibiteur non sélectif des canaux impliqués dans le SOCE dont le mécanisme est encore inconnu. Suivant des expérimentations en électrophysiologie qui employaient une concentration de 50 μM de 2-APB afin d'étudier les canaux Orai (Schindl *et al*, 2008; S.L. Zhang *et al*, 2008), une activation du canal Orai3 a été observée au lieu d'une inhibition. Ces observations indiquent que les mécanismes de régulation de l'activation des canaux Orai sont possiblement différents et leur confèrent un rôle cellulaire différent qui reste à élucider.

Les canaux calciques TRPC

Les canaux calciques nommés *transient receptor potential canonical channels* (TRPC) forment une famille de protéines composée de sept membres (TRPC1 à TRPC7). Une caractéristique commune aux TRPC est qu'ils possèdent six domaines transmembranaires. Dans le cœur, l'expression de l'ARNm de TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5 et TRPC6 a été détectée (Garcia et Schilling, 1997). Parmi les membres de cette famille de protéines, les canaux TRPC1, TRPC3 et TRPC6 sont les plus exprimés. Plusieurs études ont démontré l'implication des TRPC dans la régulation de l'homéostasie calcique cardiaque. De plus, leur contribution dans le développement de plusieurs pathologies cardiaques a été mise en lumière dans ces études (Bush *et al*, 2006; Kuwahara *et al*, 2006; Nakayama *et al*, 2006; Ohba *et al*, 2009). Cependant, les rôles cellulaires des TRPC ont été associés à des mécanismes de régulation de l'homéostasie calcique qui peuvent être différents du SOCE tels le ROCE, le CICR et la régulation de leur expression par le facteur de transcription NFAT. Ce n'est que depuis quelques années que des études ont démontré l'impact des TRPC dans la régulation du SOCE (Domínguez-Rodríguez *et al*, 2015; Sabourin *et al*, 2016; Seo *et al*, 2014). En effet, les protéines STIM1 et Orai1 assurent un recrutement coopératif des canaux TRPC à des microdomaines signalétiques situés à la membrane plasmique (Cheng *et al*, 2011). La compréhension du rôle des TRPC dans la régulation du SOCE chez les cardiomyocytes est encore peu connue. À cet effet, l'identification de protéines impliquées dans la régulation du SOCE et de l'activité des TRPC permettrait de clarifier la relation entre ces canaux calciques et ce mécanisme d'entrée du Ca^{2+} chez les cardiomyocytes.

Les cavéoles sont des carrefours importants de la signalisation du Ca^{2+}

Les composantes de la membrane plasmique sont souvent impliquées dans plusieurs voies signalétiques. Parmi ces composantes, certaines s'organisent en microdomaines ayant des fonctions précises. C'est le cas des radeaux lipidiques qui assurent plusieurs fonctions cellulaires, notamment un rôle dans la transduction de signaux cellulaires (Simons et Toomre, 2000). Les cavéoles sont une sous-classe de radeaux lipidiques qui ont attiré l'attention de plusieurs groupes de recherche au cours des dernières années pour leur implication dans une multitude de processus cellulaires et dans le développement de

nombreuses maladies. Plusieurs rôles cellulaires associés aux cavéoles ont été établis depuis plus de trente ans tel leur impact dans la régulation de la synthèse de l'oxyde nitrique endothélial, la signalisation de l'insuline, la régulation de la signalisation des protéines Src et Ras (García-Cardena *et al*, 1997; Li *et al*, 1996; Nystrom *et al*, 1999; Song *et al*, 1996). Cependant, la participation des cavéoles dans le développement de plusieurs pathologies telles les cancers, les lipodystrophies, les cardiomyopathies et leur répercussion dans la mécanoprotection cellulaire n'ont été mises en lumière que tout récemment (Galbiati *et al*, 2001; Gazzero *et al*, 2010; Goetz *et al*, 2011; Lim *et al*, 2017; Liu *et al*, 2008).

Les cavéoles sont des structures localisées à la membrane plasmique formant des invaginations en forme d'oméga inversée (U). Leur formation est assurée par trois classes de protéines : les cavéolines, les cavins et les protéines adaptatrices. La classe des cavéolines est composée de trois membres : la caveoline-1 (Cav1), la caveoline-2 (Cav2) et la caveoline-3 (Cav3). L'expression de Cav1 est ubiquitaire, celle de Cav2 est prédominante dans le tissu adipeux et les poumons et celle de Cav3 est observée uniquement dans les tissus musculaires. Chez les cardiomyocytes, Cav1 et Cav3 sont les cavéolines les plus exprimées (Scherer *et al*, 1996; Tang *et al*, 1996; Way et Parton, 1995). La classe des cavins est composée de quatre membres : la cavin1 (aussi appelée *polymerase 1 transcript release factor* [PTRF]), la cavin2 (aussi appelée *serum deprivation protein response* [SDPR]), la cavin3 (aussi appelée *srd-related gene product that binds to c-kinase* [SRBC]) et la cavin4 (aussi appelée *muscle-related coiled-coil protein* [MURC]) (Cheng et Nichols, 2016). Les cavins sont exprimés dans les tissus où les cavéoles sont présentes à l'exception de MURC où son expression est spécifique aux cellules musculaires. La classe des protéines adaptatrices regroupe plusieurs protéines ayant des fonctions cellulaires différentes, mais qui assurent le maintien de l'intégrité des cavéoles une fois que celles-ci ont été formées à la membrane plasmique. Quelques protéines appartenant à cette classe sont décrites à la prochaine section.

Mécanisme de formation des cavéoles

Les cavéolines sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique où elles forment des oligomères. Elles sont ensuite acheminées à travers le corps de Golgi

permettant leur exportation à la membrane plasmique par un mécanisme qui est dépendant du cholestérol (Hayer *et al*, 2010; Rothberg *et al*, 1992). Dans le cytoplasme, des homotrimères et hétérodimères de cavins sont formés. Ensuite, ceux-ci s'organisent en treillis moléculaires favorisant leur interaction avec les cavéolines pour initier la formation des cavéoles (Gambin *et al*, 2013; Ludwig *et al*, 2013). Les protéines adaptatrices telles Pacsin-2 et *Eps-15 homology domain 2* (EHD2) sont ensuite mobilisées aux cavéoles pour stabiliser les complexes cavéolaires et leur bourgeonnement (Hansen *et al*, 2011; Oh *et al*, 1998; Senju *et al*, 2011; Stoeber *et al*, 2012). Les cavéoles peuvent être impliquées dans la transcytose et l'endocytose cellulaire par un mécanisme qui est indépendant des clathrines en fusionnant avec des endosomes précoces nouvellement formés (Chaudhary *et al*, 2014). Dans ce sens, les cavéoles participent à la régulation du routage cellulaire de plusieurs protéines et de lipides à travers les différentes organelles et compartiments cellulaires. À l'exception des lymphocytes et des neurones, la présence des cavéoles est ubiquitaire avec une prédominance chez les adipocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires dont font partie les cardiomyocytes.

Une des raisons pour lesquelles les cavéoles sont impliquées dans une multitude de voies signalétiques est qu'elles forment des carrefours signalétiques. En effet, plusieurs protéines participantes à des voies de signalisation différentes se retrouvent au sein des cavéoles. À titre d'exemple, plusieurs récepteurs tels les RCPG et les récepteurs de type tyrosine kinase ainsi que de seconds messagers cellulaires tels la PKC et la PLC sont localisés aux cavéoles (Pani et Singh, 2009). De plus, plusieurs protéines et canaux ioniques associés à la signalisation calcique cellulaire et au SOCE tels les protéines STIM1, Orai1 et les TRPC se retrouvent au niveau des cavéoles (Pani *et al*, 2008, 2009; Pani et Singh, 2009). À ce titre, les cavéoles s'organisent en structures macromoléculaires localisées à la membrane plasmique pouvant participer à la régulation du SOCE et de l'homéostasie calcique cellulaire.

Émergence des cavins comme protéines participantes à la formation des cavéoles

Une raison importante qui a renoué l'intérêt de l'étude de l'impact des cavéoles sur la physiologie cellulaire est l'identification des cavins comme la deuxième famille de

protéines requises pour la formation des cavéoles. Bien que l'identification individuelle des membres de la famille des cavins ait été faite au courant des années 1990, leur implication dans la formation des cavéoles est récente (Hansen et Nichols, 2010).

Outre leur rôle dans la formation des cavéoles, les protéines PTRF/cavin1, SDPR/cavin2, SRBC/cavin3 et MURC/cavin4 assurent des fonctions différentes au sein de plusieurs types cellulaires même si elles possèdent des similarités dans leur structure primaire. Basés sur leur homologie dans leur séquence en acides aminés, les cavins possèdent cinq domaines communs entre elles (Kovtun *et al*, 2014). Elles possèdent trois domaines dont la similarité en acides aminés est faible et qui sont associés à des régions désordonnées sans structure précise nommées DR1, DR2 et DR3 (*low-homology disordered regions*). Elles se composent également de deux domaines de plus haute similarité ayant une structure secondaire orientée en hélice α nommés *helical region 1* (HR1) et *helical region 2* (HR2). Au sein de ces protéines, les domaines DR et HR se succèdent en alternance en commençant par le domaine DR1 situé à l'extrémité N-terminale de la protéine et se terminant par le domaine DR3 à l'extrémité C-terminale. Une particularité qui différencie les domaines DR des domaines HR est leur point isoélectrique respectif. Les domaines DR possèdent des points isoélectriques autour de 4 ce qui leur confère des propriétés acides et les domaines HR possèdent des points isoélectriques autour de 10 ce qui leur confère des propriétés basiques. Cette alternance entre les domaines DR acides et les domaines HR basiques favorisent des interactions de faibles affinités entre les cavins permettant la formation de treillis moléculaires capables d'interagir avec les cavéolines et de stabiliser la formation des cavéoles. Les cavins peuvent se regrouper en homotrimères ou en hétérotrimères dans le cytoplasme. À ce jour, seulement des hétérotrimères composés d'un dimère de la protéine PTRF/cavin1 liés avec un monomère de la protéine SDPR/cavin2 ou SRBC/cavin3 ont été observés. La trimérisation des cavins est assurée par des interactions de faibles affinités entre leur domaine HR1. Il a été proposé que les domaines HR2 contribuent à la stabilisation de ces trimères suivant leur formation en favorisant des interactions de faibles affinités supplémentaires (Kovtun *et al*, 2014). De plus, les domaines HR1 des cavins assurent leur ciblage à la membrane plasmique dans le processus de formation des cavéoles. Ces domaines effectuent des interactions de faibles affinités avec les phospholipides de la membrane plasmique en ayant des préférences pour

les phosphatidylsérines et le PIP2. Cependant, notre compréhension du rôle cellulaire des cavins associé aux cavéoles est limitée et des études supplémentaires seront requises afin d'évaluer leurs impacts sur l'homéostasie de plusieurs types cellulaires.

Rôle de la protéine MURC/cavin4 dans le cœur et les cardiomyocytes

Au cours des dernières années, l'émergence de l'importance des cavéoles dans le maintien de la fonction cardiaque et des cardiomyocytes a été mise en lumière. Parmi les composantes des cavéoles exprimées dans le cœur, la protéine MURC/cavin4 a été identifiée comme un acteur cellulaire participant à une multitude de voies de signalisation qui régulent l'homéostasie cellulaire des cardiomyocytes. Parmi ces processus cellulaires, MURC est impliquée dans la régulation de l'activité de la petite protéine G RhoA et des kinases de la famille des *mitogen-activating protein kinases* telles ERK1/2 et JNK. La protéine MURC/cavin-4 participe également dans la régulation de la myogénèse et du routage cellulaire (Housley *et al*, 2016; Miyagawa *et al*, 2017; Naito *et al*, 2015; Ogata *et al*, 2008, 2014; Tagawa *et al*, 2008). De plus, MURC est impliqué dans le développement de plusieurs pathologies reliées au système cardiovasculaire telles l'hypertension pulmonaire, l'insuffisance cardiaque, l'hypertrophie cardiaque et les cardiomyopathies dilatées (CMD) (Bernardo *et al*, 2015; Faggi *et al*, 2015; Nakanishi *et al*, 2016; Ogata *et al*, 2008, 2014; Rodriguez *et al*, 2011).

Au point de vue structurel, la forme humaine de la protéine MURC est composée de 364 acides aminés séparés dans les cinq domaines DR et HR associés aux cavins (Figure 5). Ses domaines DR1, HR1, DR2, HR2 et DR3 comprennent les acides aminés 1 à 26, 27 à 143, 144 à 177, 178 à 268 et 269 à 364 respectivement. De plus, MURC possède des domaines fonctionnels qui assurent ses différents rôles cellulaires. Elle possède un domaine *coiled-coil* (CC) (acides aminés 44 à 77) qui est impliqué dans sa localisation cellulaire, dans sa trimérisation et dans son interaction avec d'autres protéines (Naito *et al*, 2015). La protéine MURC possède également deux domaines PEST riches en proline, acide glutamique, sérine et thréonine (acides aminés 151 à 182 et 323 à 340) qui seraient associés à sa dégradation (Rogers *et al*, 1986).

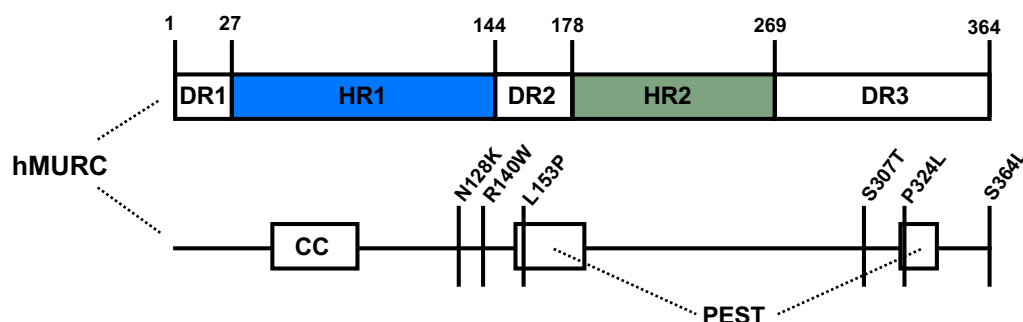


Figure 5 : Domaines et polymorphismes à nucléotide unique (SNP) connus de la protéine MURC
Schéma décrivant les différents domaines et SNP connus de la protéine MURC selon sa séquence en acides aminés. La protéine MURC est constituée de domaines communs aux membres de la famille des cavins soit DR1, HR1, DR2, HR2 et DR3 (haut). La protéine MURC possède également des domaines fonctionnels (CC et PEST) et des SNP (N128K, R140W, L153P, S307T, P324L, S364L) uniques à cette protéine parmi les membres de la famille des cavins (bas).

De plus, des polymorphismes à nucléotide unique (SNP) menant à des substitutions d'acides aminés de la protéine MURC ont associé cette protéine à des CMD (Rodriguez *et al*, 2011). Les SNP identifiés dans cette étude caractérisent des substitutions ponctuelles d'une asparagine en position 128 pour une lysine (N128K), d'une arginine en position 140 pour un tryptophane (R140W), d'une leucine en position 153 pour une proline (L153P), d'une sérine en position 307 pour une thréonine (S307T), d'une proline en position 324 pour une leucine (P324L) et d'une sérine en position 364 pour une leucine (S364L). La surexpression de ces SNP chez des cardiomyocytes ventriculaires isolés de rats nouveau-nés (NRVM) est associée à un développement hypertrophique moins soutenu et une activation de la voie signalétique de RhoA/ROCK moins importante lorsqu'elle était comparée à la surexpression de la forme sauvage de MURC dans ce type cellulaire. Ces premières observations concernant la surexpression des mutants de MURC semblent être associées à une perte de fonction de cette protéine lorsque ces SNP sont présents. Cette perte fonctionnelle de la protéine MURC pourrait être en cause dans sa contribution au développement de cardiomyopathies. Cependant, les rôles cellulaires de MURC et de ses SNP dans le cœur et les cardiomyocytes n'ont pas tous été élucidés. Une compréhension plus approfondie de l'implication de cette protéine dans l'homéostasie des cardiomyocytes est donc nécessaire afin d'élucider par quels mécanismes la protéine MURC pourrait aussi contribuer au développement de maladies du cœur.

Étude de la variation du Ca^{2+} intracellulaire en temps réel

Dans le but d'étudier de manière efficace l'homéostasie calcique cellulaire, plusieurs sondes fluorescentes se liant au Ca^{2+} et protocoles d'imagerie calcique cellulaire ont été développés. Ces outils permettent de mesurer la variation du Ca^{2+} intracellulaire en temps réel. De cette manière, il est possible d'étudier les différents mécanismes régulant l'homéostasie calcique cellulaire tels le CICR, le ROCE et le SOCE. La Figure 6 schématise le protocole d'imagerie calcique qui a été optimisé et employé pour étudier le SOCE chez les cardiomyocytes. C'est également à partir de ce protocole que plusieurs résultats (Article 1 Figures 3 et 5) sont présentés dans les sections suivantes.

Pour étudier le SOCE chez les cardiomyocytes, le protocole d'imagerie calcique se sépare en quatre étapes. Ces étapes se succèdent par des changements du milieu extracellulaire. La composition du milieu extracellulaire varie entre les étapes du protocole ce qui permet d'étudier le SOCE durant ce type d'expérimentation. La première et la dernière étape s'effectuent dans un milieu extracellulaire contenant du Ca^{2+} tandis que la deuxième et la troisième étape s'effectuent en absence de Ca^{2+} extracellulaire. Tous les milieux de culture employés durant le protocole contiennent de la nifedipine, un inhibiteur des L-VDCC, ce qui permet de prévenir l'activation du CICR et les variations spontanées de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire y étant liées. Le milieu de culture ajouté à la troisième étape contient de la caféine et de la thapsigargine (TG). La caféine active les RyR et la TG inhibe de manière irréversible la pompe SERCA. De cette manière, la caféine provoque une relâche de Ca^{2+} du RS et la TG prévient la recapture de cet ion dans le RS. Une augmentation de la concentration intracellulaire du Ca^{2+} sera observée à cette étape. De plus, la diminution de la concentration du Ca^{2+} dans le RS provoque l'activation de STIM1 et du SOCE. La concentration calcique intracellulaire retourne ensuite à un niveau comparable à celui observé en début d'expérimentation. Cette observation est principalement due à l'action de l'échangeur NCX qui transporte le Ca^{2+} à l'extérieur des cellules. À la dernière étape, le Ca^{2+} présent dans le milieu extracellulaire entre à l'intérieur des cardiomyocytes via les canaux calciques impliqués dans le SOCE qui ont été activés. Une augmentation de la concentration du Ca^{2+} est observée. L'entrée calcique de type SOCE peut être évaluée en soustrayant la concentration calcique observée à la fin de la troisième étape à celle observée après l'entrée de Ca^{2+} à la dernière étape. De cette manière,

il est possible d'évaluer si un inhibiteur ou la surexpression d'une protéine précise participe à la régulation du SOCE en modulant l'entrée de Ca^{2+} observée en fin de protocole.

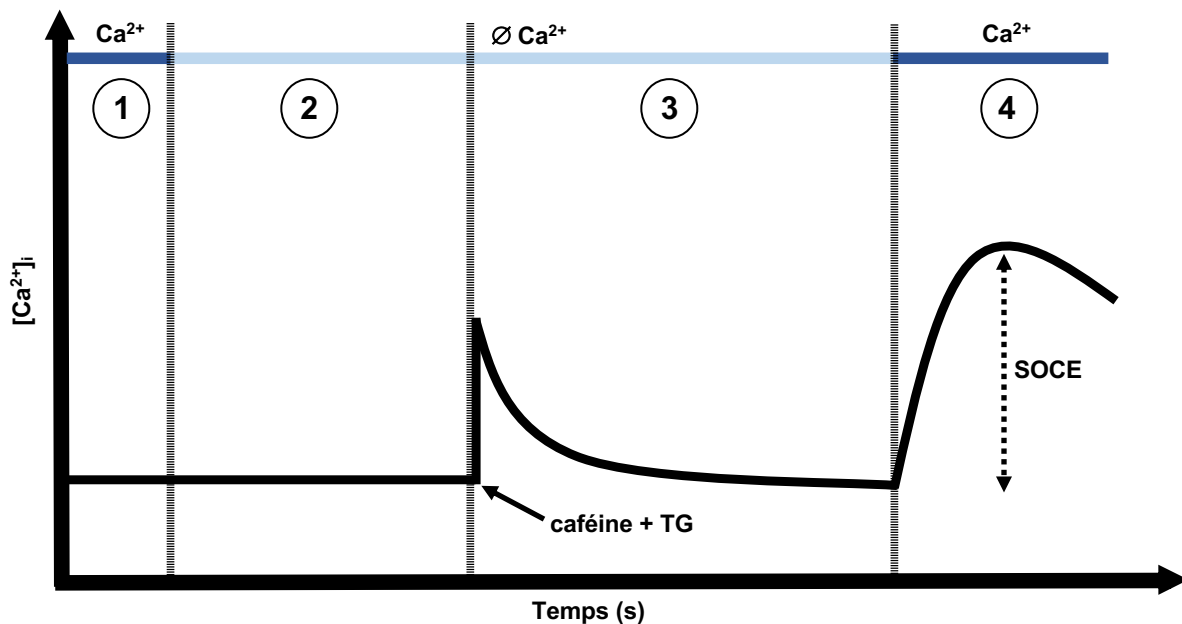


Figure 6 : Protocole d'imagerie calcique permettant d'évaluer le SOCE chez des cardiomyocytes.

Schéma décrivant la variation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) durant un protocole d'imagerie calcique afin d'évaluer le SOCE chez des cardiomyocytes. **1.** Les cellules sont incubées dans un tampon physiologique contenant du Ca^{2+} . **2.** Un changement de milieu extracellulaire pour un tampon physiologique ne contenant pas de Ca^{2+} est ensuite effectué. **3.** Un changement de milieu extracellulaire pour le même tampon physiologique et contenant de la caféine et de la thapsigargine (TG) est effectué. Une relâche de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique vers le cytoplasme et une augmentation de la concentration calcique sont observées suivant l'activation des récepteurs à la ryanodine par la caféine et l'inhibition de la pompe SERCA par la TG. Également, les composantes du SOCE s'activeront durant cette étape. Suivant l'action de l'échangeur NCX qui transportera le Ca^{2+} à l'extérieur de la cellule, la concentration calcique cellulaire diminue. **4.** Un changement de milieu extracellulaire pour un tampon physiologique contenant du Ca^{2+} est ensuite effectué. Une entrée de Ca^{2+} extracellulaire de type SOCE se produit et une augmentation de la concentration calcique intracellulaire est observée. En soustrayant la concentration du Ca^{2+} observée à la fin de l'étape 3 à celle observée suivant l'entrée de Ca^{2+} à l'étape 4, l'entrée calcique de type SOCE peut être déterminée.

But de l'étude

Lors de précédents travaux effectués au sein de notre laboratoire (Nguyen *et al*, 2013), nous avons démontré l'implication de la protéine STIM1 dans la régulation de l'homéostasie du Ca^{2+} des cardiomyocytes. Ce rôle cellulaire de la protéine STIM1 n'était pas associé à son impact dans la régulation du SOCE, mais à la régulation de l'activité du T-VDCC $\text{Ca}_v3.1$ dans un cadre physiologique. Étant donné que STIM1 peut interagir avec des protéines n'étant pas impliquées dans la régulation du SOCE, nous avons émis l'hypothèse que STIM1 possède des partenaires d'interaction dans les cardiomyocytes pouvant réguler son activité. Afin de valider cette hypothèse, des *GST-pulldowns* couplés à la spectrométrie de masse ont été effectués afin d'identifier des partenaires d'interaction potentiels de STIM1 dans le cœur. Suivant l'obtention de résultats préliminaires, nous avons identifié MURC comme étant une protéine candidate pour laquelle nous avons porté notre attention. Nous avons donc émis l'hypothèse que la protéine MURC interagit avec la protéine STIM1 et qu'elle participe à la régulation du SOCE dans les cardiomyocytes. Mes travaux de recherche ont été séparés en deux objectifs. Le premier objectif était de valider l'interaction entre MURC et STIM1 dans le cœur et les cardiomyocytes et d'identifier leur domaine respectif qui assure cette interaction. Le deuxième objectif était d'évaluer l'impact de MURC sur le SOCE dans les cardiomyocytes par une approche de gain de fonction. L'identification de la protéine MURC à titre de partenaire cellulaire de STIM1 nous a permis de mieux comprendre la régulation du SOCE dans les cardiomyocytes et d'élucider un nouveau mécanisme cellulaire par lequel la protéine MURC pourrait contribuer au développement de maladies cardiaques.

ARTICLE 1

MURC/Cavin-4 facilitates store-operated calcium entry in neonatal cardiomyocytes

Auteurs de l'article: Julien Malette, Jade Degrandmaison, Hugo Giguère, Jonathan Berthiaume, Jean-Luc Parent, Mannix Auger-Messier, Guylain Boulay

Statut de l'article: soumis à *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*

Avant-propos: Pour la rédaction de l'article, j'ai effectué la mise en forme des figures. J'ai rédigé les légendes des figures, la section *Materials and methods* et la section *Results*. Pour ma contribution au point de vue expérimental, j'ai effectué la génération des adénovirus MURC-FLAG, MURC-ΔHR1-FLAG, MURC-R140W-FLAG, HA-Orai1 et STIM1-FLAG par biologie moléculaire. J'ai également généré les protéines de fusion GST-MURC, GST-ΔHR1 et GST-R140W par biologie moléculaire. J'ai produit l'ensemble des résultats présentés dans l'article à l'exception d'un *GST-Pulldown* utilisé à la figure 1B et les expériences de coimmunoprécipitations montrées à la figure 4C. De plus, j'ai effectué l'ensemble des analyses statistiques décrites dans l'article.

Résumé : Dans le cœur, le *store-operated calcium entry* (SOCE) assure le maintien de l'homéostasie du Ca^{2+} des cardiomyocytes et participe au développement de pathologies cardiaques. Dans le but mieux comprendre comment le SOCE est régulé dans les cardiomyocytes, nous avons cherché à identifier de nouveaux partenaires cellulaires de STIM1, la principale protéine régulatrice du SOCE, qui pourraient participer à la modulation du SOCE. Nous avons identifié la protéine *muscle-related coiled-coil protein* (MURC) comme étant une protéine candidate. Nous avons validé que la protéine MURC peut interagir avec STIM1 dans le cœur et les cardiomyocytes. Nos résultats montrent que le domaine HR1 de MURC et le domaine ERM de STIM1 sont nécessaires pour que cette interaction se produise. Ensuite, nous avons validé la présence de SOCE dans des cardiomyocytes isolés de rats nouveau-nés (NRVMs) par imagerie calcique au *Fura-2/AM* en employant les inhibiteurs du SOCE SKF-96365 et 2-APB. Par la suite, nous avons évalué l'impact potentiel de MURC sur le SOCE dans les NRVMs. Nos résultats démontrent que la surexpression de MURC potentialise et accélère le SOCE dans les NRVMs et que son domaine HR1 est requis pour médier ses effets. À notre surprise, la

présence de la mutation R140W contenue dans le domaine HR1 exacerbe les effets de MURC sur le SOCE des NRVMs. Nous avons ensuite étudié les mécanismes potentiels par lesquels la surexpression de MURC potentialise le SOCE. MURC n'influence pas l'expression endogène de STIM1 et du canal calcique Orai1, mais augmente l'interaction entre ces protéines en condition basale. En somme, nous avons caractérisé MURC comme étant un nouveau partenaire cellulaire de STIM1 dans les cardiomyocytes qui participe à la régulation du SOCE. De plus, nous avons identifié un premier mécanisme potentiel par lequel la forme mutée de MURC (R140W) pourrait contribuer au développement de cardiomyopathies.

MURC/CAVIN-4 FACILITATES STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY IN NEONATAL CARDIOMYOCYTES

Julien Malette^a, Jade Degrandmaison^a, Hugo Giguère^a, Jonathan Berthiaume^a, Jean-Luc Parent^b, Mannix Auger-Messier^{c,*}, Guylain Boulay^{a,*}

^a Département de Pharmacologie et Physiologie, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, QC, Canada J1H 5N4

^b Département de Médecine – Service de Rhumatologie, Centre de Recherche du CHUS, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada J1H 5N4

^c Département de Médecine – Service de Cardiologie, Centre de Recherche du CHUS, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada J1H 5N4

ARTICLE INFO

Keywords:

MURC

Cavin-4

STIM1

Orail

Store-operated calcium entry

Cardiomyocyte

ABSTRACT

Intact store-operated calcium entry (SOCE) mechanisms ensure the maintenance of Ca^{2+} homeostasis in cardiomyocytes while their dysregulation promotes the development of cardiomyopathies. To better understand this calcium handling process in cardiomyocytes, we sought to identify unknown protein partners of stromal interaction molecule 1 (STIM1), a main regulatory protein of SOCE. We identified the muscle-related coiled-coil protein (MURC), also known as Cavin-4, as a candidate and showed that MURC interacts with STIM1 in the heart and cardiomyocytes. This interaction occurs via the HR1 and ERM domains of MURC and STIM1, respectively. Our results also demonstrated that the overexpression of MURC in neonatal rat ventricular myocytes (NRVM) is sufficient to potentiate SOCE and that its HR1 domain is required to mediate this effect. Interestingly, the R140W-MURC mutant, a missense variant of the HR1 domain associated with human dilated cardiomyopathy, exacerbates the SOCE increase in NRVM. Although the

endogenous expression of STIM1 and Ca^{2+} channel Orai1 is not modulated under these conditions, we showed that MURC increases the interaction between these proteins under resting conditions. Our study provides novel evidence that MURC regulates SOCE by interacting with STIM1 in cardiomyocytes. In addition, we identified a first potential mechanism by which the R140W mutation may contribute to calcium mishandling and the development of cardiomyopathies.

Abbreviations: 2-APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate; β Gal, β -galactosidase; DR, disordered region; ERM, Ezrin/Radixin/Moesin; GST, glutathione S-transferase; HBSS, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free Hank's balanced salt solution; HEK 293A, human embryonic kidney cells, clone 293A; HR, helical region; HRP, horseradish peroxidase; IPTG, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; MURC, muscle-related coiled-coil protein; NRVM, neonatal rat ventricular myocyte; PBS, phosphate-buffered saline; SR, sarcoplasmic reticulum; STIM1, stromal interaction molecule 1; SOCE, store-operated Ca^{2+} entry; TG, thapsigargin

* Corresponding authors at:

Département de Médecine – Service de Cardiologie, Centre de Recherche du CHUS, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada, J1H 5N4

Email: Mannix.Auger-Messier@USherbrooke.ca (M. Auger-Messier)

Département de Pharmacologie et Physiologie, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, QC, Canada. J1H 5N4

Email: Guylain.Boulay@USherbrooke.ca (G. Boulay)

1. Introduction

Ca^{2+} is central for a variety of essential physiological processes such as cell proliferation, differentiation, motility, secretion, excitation, and apoptosis [1]. In cardiomyocytes, an elevation of sarcoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$ is absolutely required for the excitation-contraction coupling that triggers sarcomeric actin-myosin movements [2]. Excitation-contraction coupling relies on the synergic action of L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels and cardiac ryanodine receptors that provide Ca^{2+} through Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release [3,4]. Proteins involved in another crucial process known as store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) are also expressed in cardiomyocytes [5,6]. This process has been best characterized in non-excitable cells and is essential for replenishing Ca^{2+} stores in the endoplasmic reticulum. SOCE also plays a role in the development of cardiomyocyte hypertrophy [7–9]. Stromal interaction molecule 1 (STIM1) is one of the two major components of SOCE [10,11]. It is a single-pass transmembrane protein located on the endoplasmic/sarcoplasmic reticulum (SR) where it serves as a dynamic Ca^{2+} sensor. Upon store depletion, STIM1 detects a decrease in SR $[\text{Ca}^{2+}]$ through its EF-hand domain and forms punctae that move near the plasma membrane, where it directly binds to and activates the oligomeric Ca^{2+} channel Orai1 at the plasma membrane [12–14].

We and others previously showed that STIM1 also regulates the contractile activity of cardiomyocytes by controlling the cell surface density of the voltage-dependent Ca^{2+} channel [15–17]. STIM1 presumably interacts with other proteins to regulate the trafficking of the Ca^{2+} channel at the plasma membrane. However, none of the proteins currently known to interact with STIM1, such as STIMATE [18], SARAF [19–21], or SPPL3 [22], have an impact on intracellular trafficking. We thus hypothesized that the identification of proteins implicated in intracellular trafficking that are not known to interact with STIM1 could enhance our understanding of the calcium handling mechanisms involved in the biology of cardiomyocytes.

In the present study, we used a glutathione S-transferase (GST) affinity column combined with mass spectrometry to identify the MURC/Cavin-4 protein as a novel STIM1 interactor. We showed that the Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) domain of STIM1 interacts with the helical region 1 (HR1) of MURC. We also showed that the overexpression of

MURC in neonatal rat ventricular myocytes (NRVM) augments thapsigargin-induced SOCE and that this effect is exacerbated by a missense variant of MURC previously identified from a patient with dilated cardiomyopathy. Taken altogether, these results show for the first time that MURC impacts the Ca^{2+} homeostasis of cardiomyocytes.

2. Materials and methods

2.1 Materials

The Neonatal Cardiomyocyte Isolation System, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free Hank's balanced salt solution (HBSS), soybean trypsin inhibitor, trypsin, and collagenase were purchased from Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ, USA). The M199 medium, fetal bovine serum, glutamine, penicillin, streptomycin, and isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) were purchased from Wisent (St-Bruno, QC, Canada). The fura-2/AM, thapsigargin, fibronectin, and Luminata™ Western horseradish peroxidase (HRP) Crescendo ECL Substrate were purchased from EMD Millipore (Burlington, MA, USA). The SKF-96265 was purchased from Alfa Aesar (Haverhill, MA, USA). Unless otherwise stated, every other reagent was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Anti-hexon antibody (ab8249) was purchased from Abcam (Cambridge, UK). Anti-STIM1 (sc-16684) and anti-Orai1 (sc-377281) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Anti-MURC (HPA020973) and anti-FLAG (F7425) antibodies were purchased from Sigma. Anti-HA.11 antibody (901503) was purchased from BioLegend (San Diego, CA, USA). Anti-HA-peroxidase antibody (12 013 819 001, clone 3F10) was purchased from Roche (Basel, Switzerland). Rabbit anti-GST HRP-linked antibody (A190-122P) was purchased from Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, TX, USA). Anti-GAPDH (5174), anti-rabbit IgG HRP-linked (7074) and anti-mouse IgG HRP-linked (7076) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA).

2.2 Neonatal rat ventricular myocyte isolation and culture

All animal procedures respected NIH and Canadian Council on Animal Care Use and Care of Laboratory Animals guidelines and were approved by the Université de Sherbrooke Institutional Ethics Committee. NRVM were extracted from the hearts of 1-3-day-old

Sprague Dawley new born rats (Charles River, Senneville, QC, Canada). The rats were euthanized, and the atria were removed from the excised hearts. The isolated ventricles were cut in half and were incubated in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free HBSS supplemented with trypsin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 4°C for 16-18 h in vented-cap tubes with slow agitation. Soybean trypsin inhibitor (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 100 units/mL of collagenase were then added to the tubes, and the ventricles were incubated for an additional 30 min at 37°C . Following trituration and filtration through a 70-micron cell strainer, the cells were pre-plated on 10-cm dishes at 37°C for 30 min to reduce non-cardiomyocyte contamination (pre-plated NRVM). Enriched NRVM were resuspended in M199 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL of penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of streptomycin. The cells were plated at a density of 43,000-86,000 cells/ cm^2 on fibronectin-coated glass coverslips for calcium imaging or on gelatin-coated dishes for other experiments. NRVM were infected with adenoviruses at a multiplicity of infection of 1:100 and were cultured in a humidified incubator with a 5% CO_2 atmosphere at 37°C for 48-72 h before analysis.

2.3 Cloning and adenovirus generation

The assembly and subcloning of hMURC constructs from hMURC-myc-DDK cDNA (OriGene, Rockville, MD, USA), HA-hOrai1 constructs from hOrai1-eYFP cDNA (OriGene), and hSTIM1 constructs from hSTIM1-eCFP cDNA (OriGene) into the Gateway® pENTR3C Dual Selection vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) or the pGEX-4T-3 vector (Clontech, Mountain View, CA, USA) were performed using NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning kits (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA).

The recombination with the Gateway® pAd/CMV/V5-DEST™ adenovirus vector (Invitrogen) was performed using the Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix (Invitrogen). The transfection of 4 μg of linearized vector was performed in a 35-mm dish with 90-100% confluent HEK 293A cells using Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Invitrogen). Seven to 10 days after transfection, the adenoviruses were collected from lysed cells that had been freeze-thawed three times. The adenoviruses were amplified by transferring 200 μL of primary stock to a 10-cm dish with 90-100% confluent HEK 293A cells. The cells and supernatants were collected 48-72 h later, were freeze-thawed three times, and were centrifuged at 100 x g for 5 min to remove cellular debris. The

supernatants were collected, were aliquoted, and were stored at -80°C . Serial dilutions of each adenovirus were used to infect HEK 293A cells and to determine their respective titers. Individual immunostained hexon-expressing cells were quantified 36 h post-infection. The adenovirus encoding β -galactosidase (βGal) was a generous gift from Jeffery D. Molkentin (HHMI, Cincinnati, OH, USA).

2.4 Measurement of intracellular free Ca^{2+} concentrations

The method used to measure intracellular free Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) has been described elsewhere [15]. Briefly, pre-plated NRVM were grown on fibronectin-coated glass coverslips. Forty-eight hours post-infection, fresh culture media was added to the cultured cells. Seventy-two hours post-infection, the coverslips were washed once in HBSS (120 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 0.8 mM MgSO_4 , 10 mM glucose, 1.8 mM CaCl_2 , 20 mM Hepes, pH 7.4) and were loaded with fura-2/AM (4 μM in HBSS containing 0.02% F-127 pluronic acid) for 30 min at 37°C in the dark. After being washed twice with HBSS, the coverslips were put in a circular open-bottom chamber, which was mounted on the stage of an Olympus IX71 microscope (Olympus Canada Inc., Toronto, ON, Canada) equipped with a Lambda-DG-4 illuminator (Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA). $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was measured in the fura2-loaded NRVM (10 to 30 cells/coverslip) by fluorescence videomicroscopy using alternating excitation wavelengths of 340 nm (26 nm bandpass) and 387 nm (11 nm bandpass). Emitted fluorescence was monitored at 510 nm (84 nm bandpass) through a 415-570 nm dichroic mirror, and the fluorescence intensity was detected using an EvolveTM EMCCD camera (Photometrics, Tucson, AZ, USA). MetaFluor software (Universal Imaging Corporation, Bedford Hills, NY, USA) was used to digitize and analyze the fluorescent images. The method of Grynkiewicz *et al.* [23] was used to calculate free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from the 340/387 fluorescence ratios. EGTA (0.5 mM) was added to the Ca^{2+} -free HBSS to chelate any remaining extracellular Ca^{2+} . All reagents were diluted to their final concentrations in HBSS and were applied to the NRVM by surface perfusion.

2.5 Western blot analysis

Proteins were extracted from cultured NRVM using RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM 1,4-dithiothreitol, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) supplemented with a

Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail) (Bimake, Houston, TX, USA). Protein concentrations were determined using a DC™ Protein Assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Lysates were diluted with equal amounts of protein (20-40 µg) in SDS loading buffer and were resolved by SDS-PAGE. The protein bands were transferred to a nitrocellulose membrane (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). The membranes were blocked in TBS-T buffer supplemented with 5% non-fat skim milk and were probed with primary antibodies for 16 h at 4°C followed by HRP-coupled secondary antibodies for 2 h at room temperature to detect protein bands. Western blot image acquisition and analyses were performed using a ChemiDoc MP station and Image Lab software (Bio-Rad), respectively.

2.6 Immunoprecipitation

The NVRM were plated at a density of 83,000 cells/cm² in 100-mm cell culture dishes for the immunoprecipitation assays. Approximately 4-6 h after seeding, the cells were infected with the adenoviral constructs, and the multiplicity of infection was adjusted to a total of 60 using the control βGal adenovirus. Forty-eight hours post-infection, the cells were washed twice with Ca²⁺-free HBSS and were incubated in Ca²⁺-free HBSS for 10 min at 37°C. For conditions where Ca²⁺ release from intracellular stores was to be induced, the Ca²⁺-free HBSS was supplemented with 10 mM caffeine and 2 µM thapsigargin (TG). The NVRM were then washed with 0.5% (v/v) formaldehyde in Ca²⁺/Mg²⁺-free phosphate-buffered saline (PBS) and were crosslinked for 5 min at room temperature in the same solution. The NVRM were washed twice with ice-cold PBS supplemented with 1.25 M glycine and were harvested in 700 µL of lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM Na₄P₂O₇, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 1% IGEPAL, and 5 mM EDTA) supplemented with protease inhibitors (10 µM pepstatin, 10 µM antipain, 10 µM leupeptin, and 10 µM chymostatin; Roche). After a 2-h incubation in lysis buffer at 4°C with rotation, the lysates were centrifuged at 17,000 x g for 20 min at 4°C. The protein concentrations in the supernatants were determined and were adjusted to the same concentration with lysis buffer in a final volume of 800 µL. The lysates were then incubated with 2 µg of purified anti-HA.11 antibody for 1.5 h at 4°C with rotation. A volume of 35 µL of 50% protein G-agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) was added, and the mixtures were incubated overnight at 4°C with rotation. The mixtures were then centrifuged at 1,500 x g for 2 min

and were washed four times with lysis buffer. The immunoprecipitated proteins were suspended in 50 μ L of SDS loading buffer. The initial lysates and the immunoprecipitated proteins were boiled for 5 min, were analyzed by SDS-PAGE, and were immunoblotted with the indicated specific antibodies.

2.7 GST-pulldown assays

In order to induce the expression of the GST-fusion protein, the cDNA constructs were transformed into BL-21 Rosetta bacteria, which were incubated with 1 mM IPTG for 3 h at 30°C. The bacteria were then centrifuged at 3,000 x g for 30 min. The pellets were resuspended in 1.25 mL of pulldown lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Triton X-100, 5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Bimake)), were sonicated twice for 10 s on ice, and were centrifuged at 17,000 x g for 15 min. The GST fusion proteins in the supernatant were affinity purified using Glutathione-SepharoseTM 4B beads (GE Healthcare, Mississauga, ON, Canada).

For the pulldown assays, 2 mg of protein lysates from adult female rat hearts were affinity-purified with 50 μ L of a slurry of GST protein beads for 2 h at 4°C with rotation. The beads were then washed the times with the pulldown lysis buffer and were resuspended in SDS loading buffer. The beads were boiled for 5 min, and the proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies. For the pulldown assays with cultured NRVM, 100 μ g of protein lysates from cells infected with the indicated adenoviruses were incubated with affinity purified GST protein beads.

2.8 Statistical analysis

All experiments were performed using at least three independent cell isolations. The statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). A two-tailed unpaired T-test was used for hypothesis testing when appropriate. Quantitative data are expressed as means \pm standard deviations, and differences with a P value < 0.05 were considered significant.

3. Results

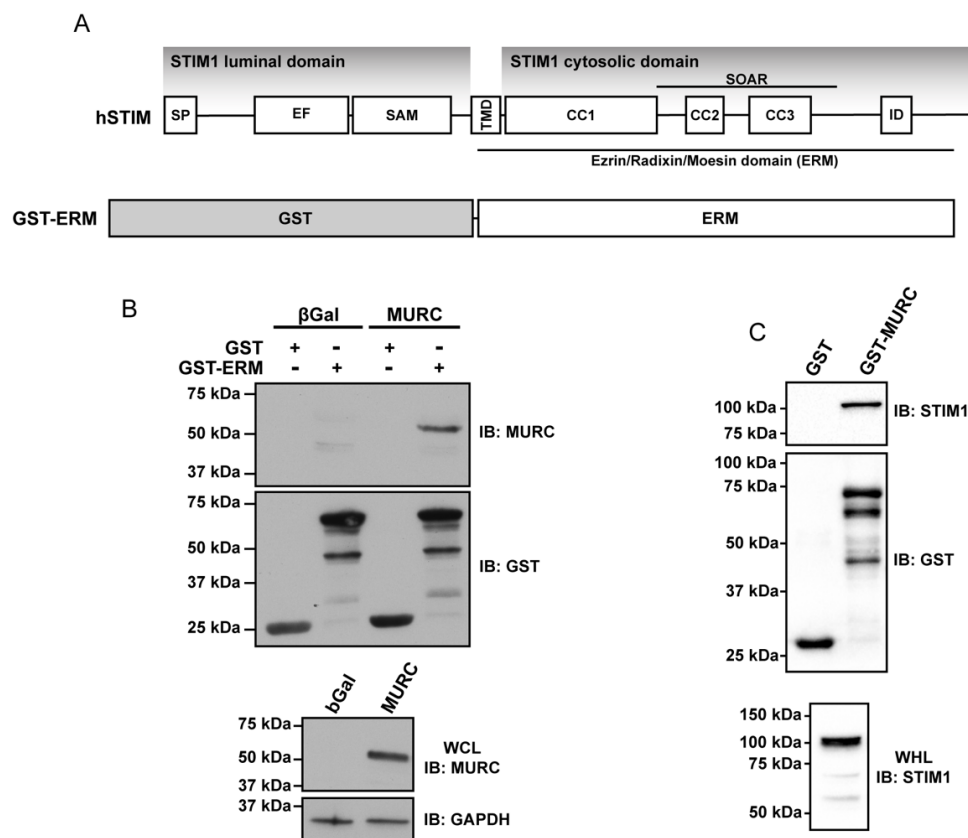
3.1. MURC/Cavin-4 interacts with the ERM domain of STIM1

Previous reports from independent laboratories [24–27], including our own [15], indicated that STIM1 acts on different Ca^{2+} entry pathways in the heart. To identify novel interactors of STIM1 expressed in the heart, we fused the ERM domain of STIM1 to GST (amino acids 219-548; GST-ERM; Article 1 Figure 1A) and used it for a GST-pulldown assay combined with analytical liquid chromatography-mass spectrometry. We used a lysate of RIPA-solubilized proteins from adult rat hearts to identify MURC, also known as Cavin4, as a potential candidate. We confirmed the interaction between MURC and the ERM domain of STIM1 using lysates from NRVM overexpressing MURC. As can be seen in Article 1 Figure 1B, MURC was efficiently retained by GST-ERM (lane 4), while no significant binding was observed with GST alone (lane 3) or with a lysate from control NRVM overexpressing βGal (lanes 1 and 2). To confirm these results, we used a GST-fused hMURC protein (GST-MURC) as bait to pull down endogenously expressed STIM1 from a whole heart protein lysate. As can be seen in Article 1 Figure 1C, cardiac STIM1 was specifically detected in the GST-MURC precipitate but not in the GST control. These results suggest that STIM1 can interact with MURC and that its ERM domain is sufficient to mediate this interaction.

3.2. The HR1 domain of MURC is required for the interaction with STIM1

MURC shares sequence homology with other Cavin family proteins in two clearly delineated helical regions (HR1 and HR2). All members of the Cavin family also contain three non-homologous/disordered regions (DR1, DR2, and DR3) [28–30] (Article 1 Figure 2A). To identify which MURC domains contribute to its interaction with STIM1, the following constructs with two adjacent domains were fused to GST: GST-DR1/HR1 (amino acids 1-143), GST-HR1/DR2 (amino acids 27-177), GST-DR2/HR2 (amino acids 144-268), and GST-HR2/DR3 (amino acids 178-364). The ability of endogenously expressed cardiac STIM1 to interact with these domains was assessed by GST-pulldown,

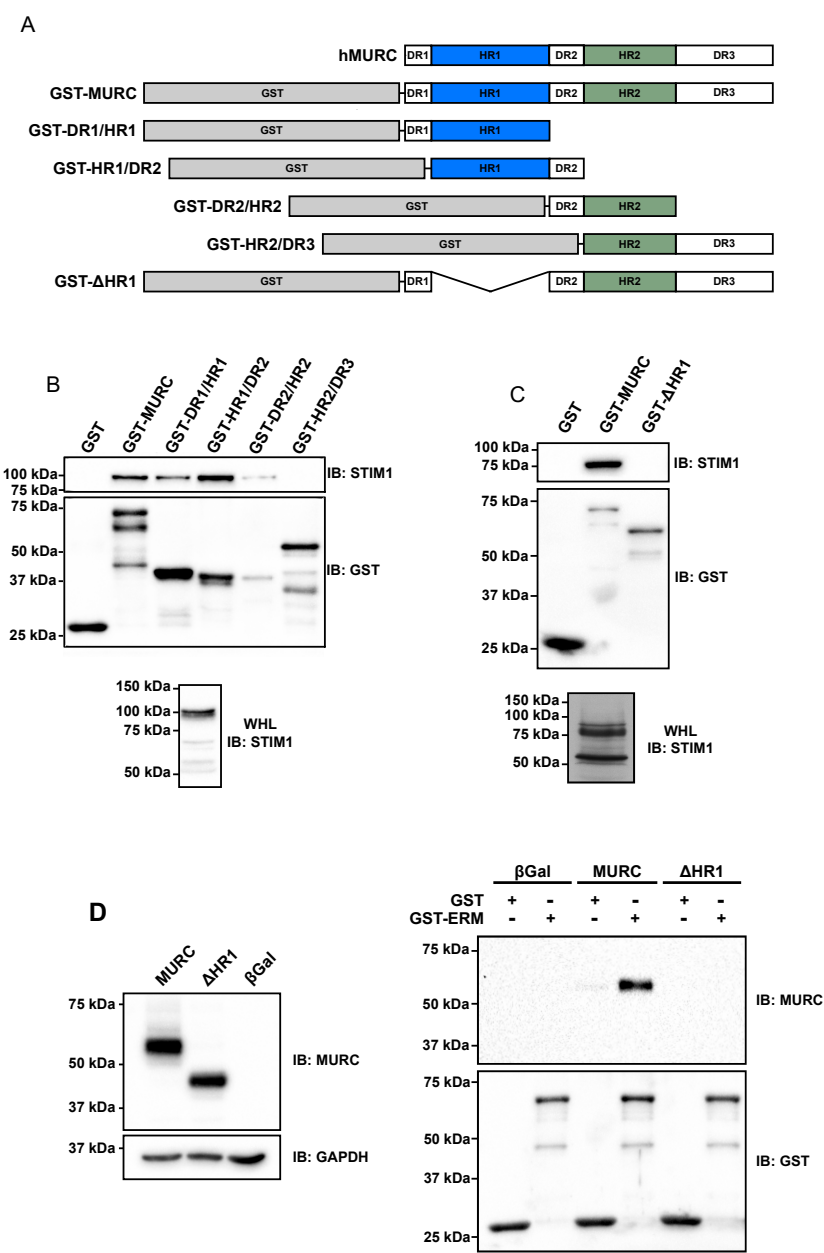
and the presence of STIM1 in the precipitate was detected by immunoblotting (IB).



Article 1 Figure 1. MURC interacts with the ERM domain of STIM1. (A) Schematics of full-length human STIM1 (hSTIM1) and the GST-ERM domain of hSTIM1 (GST-ERM) fusion protein. (B) Forty-eight hours after infecting NVRM with the control βGal adenovirus or the MURC adenovirus, the cells were lysed and the protein lysates were GST pulled down using GST alone or GST-ERM as bait. The presence of MURC in the pulldown precipitates and whole cell lysate (WCL) was evaluated by immunoblotting (IB). (C) A protein lysate from adult rat hearts was GST pulled down using GST alone or GST-fused hMURC (GST-MURC) as bait. The presence of endogenous STIM1 in the whole heart protein lysate (WHL) and in the pulldown precipitates was evaluated by immunoblotting (IB). At least four independent protein lysate isolations were performed to evaluate the interaction between MURC and STIM1 by GST-pulldown ($n \geq 4$).

As can be seen in Article 1 Figure 2B, STIM1 strongly interacted with GST-HR1/DR2 and was also present in the GST-DR1/HR1 and GST-DR2/HR2 precipitates, but not in the GST-HR2/DR3 precipitate. These results suggest that HR1 and to some extent DR2 participate in the interaction with STIM1. We used the same approach to test a deletion variant of hMURC devoid of its HR1 domain (GST-ΔHR1; amino acids 1-26 and 144-364; Article 1 Figure 2A) and showed that this domain is absolutely required to mediate the formation of a complex between the two proteins (Article 1 Figure 2C). Cardiac STIM1 was only detected in the GST-MURC precipitate and was absent from the

GST and GST-ΔHR1 precipitates. To further support these observations, we overexpressed MURC and ΔHR1-MURC in NRVM for 48 h. The cells were lysed and were then incubated with GST-ERM. As can be seen in Article 1 Figure 2D, MURC was detected in the GST-ERM precipitate while ΔHR1-MURC did not interact with the recombinant protein. No significant binding was observed with GST alone or with proteins in the βGal-infected NRVM lysate. These results suggest that the HR1 domain is key for the interaction of MURC with STIM1.

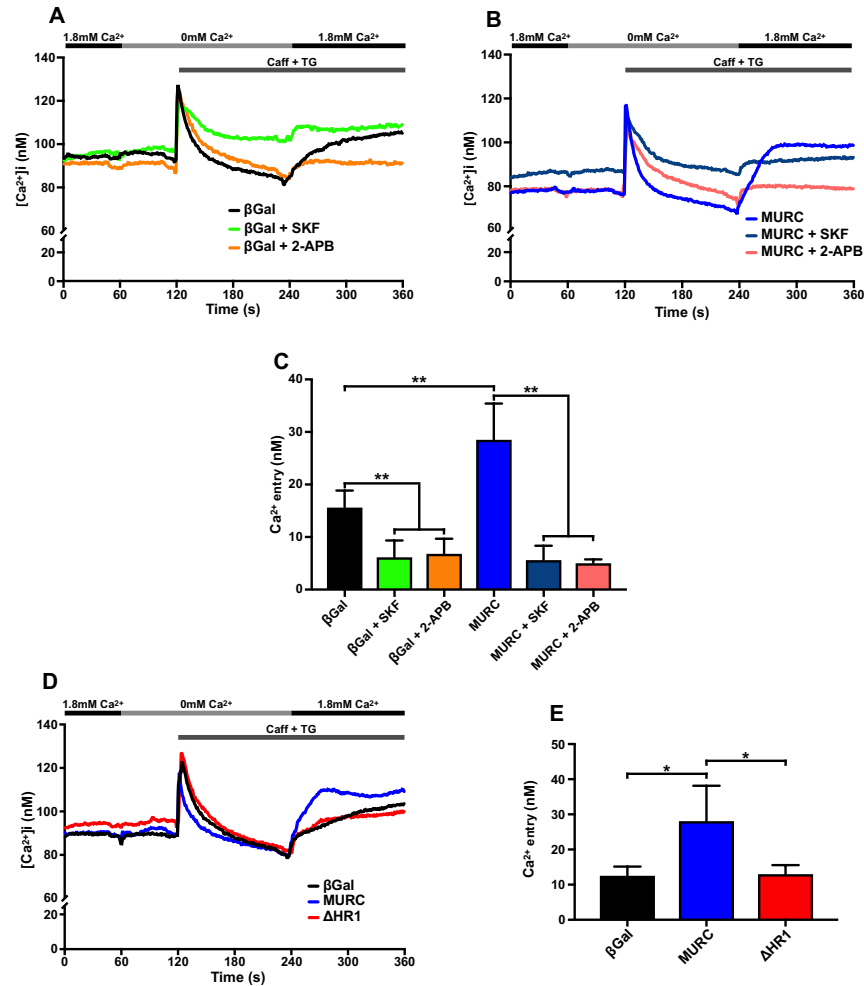


Article 1 Figure 2. The HR1 domain of MURC is required for its interaction with STIM1. (A) Schematics of the full-length human MURC protein (hMURC), GST-fused hMURC (GST-MURC), and the deletion variants (GST-DR1/HR1, GST-HR1/DR2, GST-DR2/HR2, GST-HR2/DR3, and GST-ΔHR1) of hMURC. (B) and (C) Protein lysates purified from adult rat hearts were GST pulled down with GST alone or with GST-MURC as bait. The presence of endogenous STIM1 in a whole heart protein lysate (WHL) and in the GST-pulldown precipitates was evaluated by immunoblotting (IB). (D) Forty-eight hours after infecting NRVM with control a βGal, MURC, or MURC-ΔHR1 adenovirus, the cells were lysed and MURC protein overexpression was evaluated by immunoblotting (IB) (left panel). Protein lysates were GST pulled down with GST alone or with GST-ERM as bait. The presence of MURC in the GST-pulldown precipitates was evaluated by immunoblotting (IB) (right panel). Four independent protein lysate isolations were performed to evaluate the interaction between MURC and STIM1 by GST-pulldown (n = 4).

3.3 MURC overexpression potentiates SOCE in NRVM

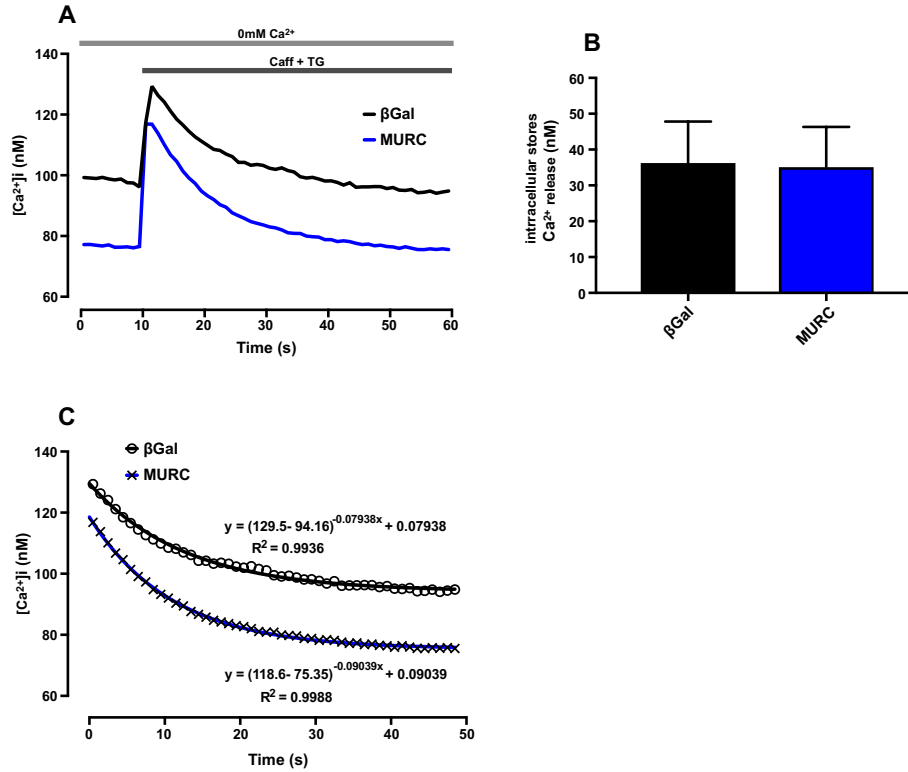
We next investigated the impact of MURC overexpression on the activation of SOCE in NRVM. Article 1 Figures 3A and 3B show the average Ca^{2+} transient during the Ca^{2+} -imaging protocol using NRVM overexpressing either βGal (black line in 3A) or MURC (blue line in 3B). To validate the presence of SOCE during these protocols, NRVM were incubated with nifedipine to prevent Ca^{2+} entry at the plasma membrane via L-type calcium channels. The NRVM were treated separately with two SOCE inhibitors: SKF-96365 (yellow line in 3A and purple line in 3B) or 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) (orange line in 3A and pink line in 3B). To induce intracellular store depletion and SOCE activation, 10 mM caffeine and 2 μM TG were added to the perfusion buffer in the absence of extracellular Ca^{2+} . Upon store depletion, there was no statistically significant difference in the Ca^{2+} transient between the βGal and MURC conditions (Article 1 Supplemental Figure 1A and 1B). Article 1 Figure 3C shows the average Ca^{2+} entry in NRVM when Ca^{2+} is re-introduced. In the control condition, we observed a small Ca^{2+} 15.7 ± 3.1 nM transient. Ca^{2+} entry was significantly reduced in this condition when cells were incubated with SKF-96365 (6.2 ± 3.1 nM) or with 2-APB (6.9 ± 2.8 nM). We observed a Ca^{2+} entry of 28.6 ± 6.8 nM in NRVM overexpressing MURC, which is a significant 1.8-fold increase compared to the control βGal condition. However, Ca^{2+} entry was significantly reduced when the cells were incubated with SKF-96365 (5.7 ± 2.7 nM) or 2-APB (5.1 ± 0.7 nM).

Since the HR1 domain of MURC is required for its interaction with STIM1 in NRVM (Article 1 Figure 2), we next ascertained whether this domain is required to mediate the effect of MURC on SOCE in NRVM. Article 1 Figures 3D and 3E show the average Ca^{2+} transient and the average Ca^{2+} entry when Ca^{2+} is re-introduced in NRVM overexpressing either βGal (black), wild-type MURC (blue), or ΔHR1-MURC (red).



Article 1 Figure 3. MURC requires its HR1 domain to increase SOCE-mediated Ca^{2+} entry in NRVM. (A) and (B) Traces showing average intracellular Ca^{2+} transients in NRVM 72 h after infection with a control β Gal adenovirus (black line) or a MURC (blue line) adenovirus by Ca^{2+} imaging. The SOCE protocol was performed in the presence or absence of the non-specific SOCE inhibitors SKF-96365 (10 μ M; SKF; green and purple lines) or 2-aminoethoxydiphenyl borate (50 μ M; 2-APB; orange and pink lines). (C) The bar graph depicts the average Ca^{2+} entry upon the readdition of Ca^{2+} with the SOCE protocol in panels A and B. (D) The same Ca^{2+} imaging protocol was performed to compare the impact on the Ca^{2+} transient of overexpressing the MURC- Δ HR1 (Δ HR1) deletion mutant in NRVM compared to overexpressing control β Gal or wild-type MURC. (E) The bar graph depicts the average Ca^{2+} entry upon Ca^{2+} readdition using the SOCE protocol in panel D. The values in the bar graph represent means \pm standard deviations of Ca^{2+} entry from at least four independent cell isolations ($n \geq 4$). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ using an unpaired Student's t-test).

In response to TG-mediated store depletion, Ca^{2+} entry in NRVM overexpressing β Gal (12.6 ± 2.6 nM) was significantly increased by the overexpression of MURC (28.1 ± 10.0 nM), which is in agreement with the previous results. However, the Ca^{2+} entry measured in NRVM overexpressing Δ HR1-MURC (13.0 ± 2.5 nM) was similar to that of the β Gal control. Taken together, these results indicate that there is a small SOCE in NRVM and that MURC overexpression relies on its HR1 domain to potentiate SOCE in these cells.

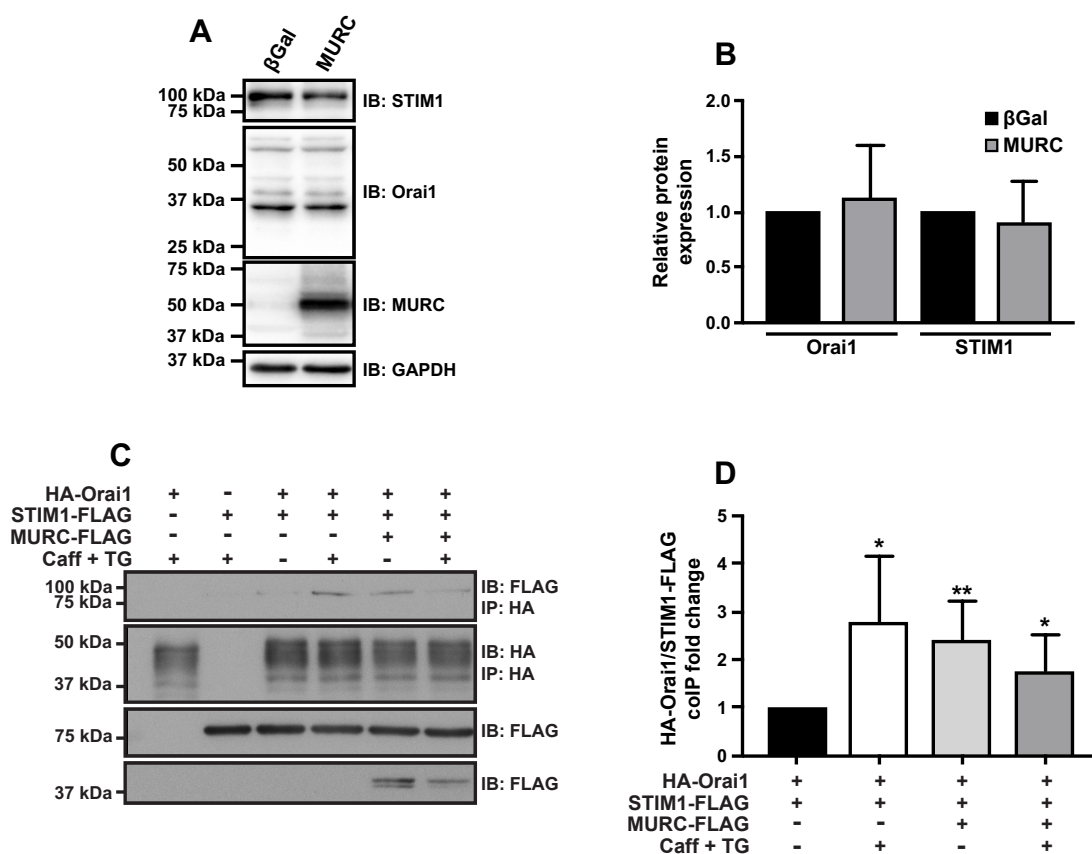


Article 1 Supplemental Figure 1. MURC overexpression does not modulate Ca^{2+} release and reuptake from intracellular stores. (A) Trace showing the average intracellular Ca^{2+} transients in NRVM 72 h after infection with a control βGal adenovirus (black line) or a MURC (blue line) adenovirus by Ca^{2+} imaging as depicted in Article 1 Figure 3A and 3B, respectively. (B) The bar graph depicts the average Ca^{2+} entry values from the SOCE protocol shown in panel A. (C) Non-linear mono-exponential regression fitting of Ca^{2+} recapture following intracellular store depletion and SOCE activation depicted in panel A, with their respective equation and R^2 value. The values in the bar graph represent the means \pm standard deviations of Ca^{2+} entry from at least four independent cell isolations ($n \geq 4$).

3.4 MURC overexpression in NRVM modulates the STIM1-Orai1 interaction in the resting condition

It is possible that SOCE potentiation by MURC overexpression ensues from a change in the expression of STIM1 and Orai1 *per se*. To verify this possibility, we first assessed the endogenous expression levels of STIM1 and Orai1 in NRVM overexpressing βGal or MURC by immunoblotting. As can be seen in Article 1 Figures 4A and 4B, there was no apparent difference in relative STIM1 expression (0.91 ± 0.37) in NRVM overexpressing MURC compared to the control condition. Similar results were obtained with the relative expression of Orai1 (1.12 ± 0.48). The increase in SOCE in MURC overexpressing NRVM may also result from an enhanced interaction between Orai1 and STIM1. To test this possibility, we assessed the extent of STIM1-Orai1 complex formation

with a co-immunoprecipitation assay using HA-Orai1 as the target protein. The STIM1-Orai1 interaction was evaluated in resting conditions or upon SOCE activation by adding caffeine and TG to induce intracellular Ca^{2+} store depletion. Article 1 Figure 4C shows an immunoblot of an immunoprecipitate of HA-Orai1. The presence of STIM1-FLAG revealed with using an anti-FLAG antibody. As expected, SOCE activation enhanced the interaction between STIM1 and Orai1 2.80 ± 1.38 -fold compared to the control resting condition (Article 1 Figure 4D). Interestingly, MURC overexpression was also sufficient to increase STIM1-Orai1 complex formation in resting (1.78 \pm 0.74-fold) and Ca^{2+} store-depleted (2.44 ± 0.76 -fold) conditions when compared to the control resting condition. These results show that MURC overexpression in NRVM favors the interaction of STIM1 with Orai1.



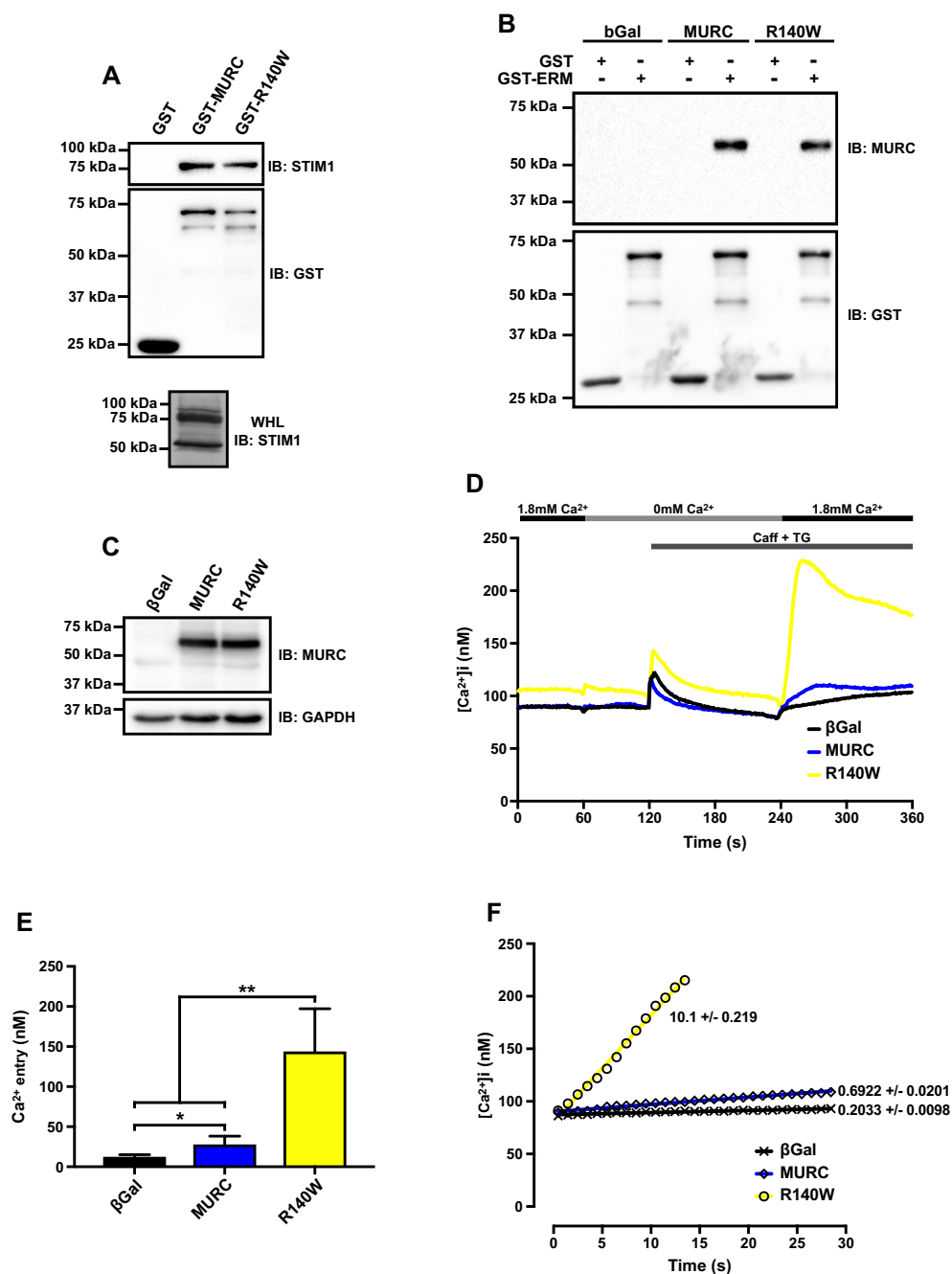
Article 1 Figure 4. MURC potentiates the STIM1 interaction with Orai1 in NRVM. (A) Representative evaluation by immunoblotting (IB) of endogenous STIM1 and Orai1 expression levels in NRVM infected with a control β Gal adenovirus or an MURC adenovirus. (B). The bar graph depicts the GAPDH-normalized protein expression of Orai1 and STIM1 in NRVM infected with a MURC (gray bar) adenovirus relative to NRVM infected with a control β Gal (black bar) adenovirus. (C) Representative co-immunoprecipitation assay (coIP) from NRVM overexpressing HA-Orai1 and STIM1-FLAG in combination with β Gal or MURC-FLAG. The HA-Orai1 and STIM1-FLAG interaction, which was used as a positive control, was induced by SOCE activation by adding 10 mM caffeine (Caff) and 2 μ M thapsigargin (TG) to the culture media for 10 min. The presence of proteins in the coIP and protein lysates was evaluated by immunoblotting (IB). (D) Quantification of the HA-Orai1/STIM1-FLAG interaction by adjusting the FLAG coIP protein intensity to the HA-Orai1 IP protein intensity detected in panel C. The coIP/IP intensity ratios were then normalized to the unstimulated β Gal condition. The values in the bar graphs represent the means \pm standard deviations of at least three independent cell isolations ($n \geq 3$). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ using a one sample t-test).

3.5 HR1 containing the R140W substitution enhances the effect of MURC on SOCE in NRVM

Rodriguez *et al.* [31] identified several point mutations in the gene encoding MURC that were related to dilated cardiomyopathy in humans. One of these mutations, the R140W missense variant, is found in the HR1 domain of MURC. We thus ascertained whether R140W-MURC also influences the interaction with STIM1 and regulates SOCE in NRVM. We used GST, GST-fused hMURC (GST-MURC), and GST-fused R140W-hMURC (GST-R140W) as bait to pull down endogenously expressed STIM1 from whole heart protein lysates. As can be seen in Article 1 Figure 5A, STIM1 was detected in the GST-MURC and GST-R140W precipitates, but not in the GST control. To further support this observation, GST-pulldowns were performed using GST alone or GST-ERM as bait with protein lysates from NRVM overexpressing control β Gal, wild-type MURC, or the R140W-MURC mutant. As can be seen in Article 1 Figure 5B, MURC and R140W-MURC were detected when GST-ERM was used as bait, but not when GST alone was used. These results show that the R140W mutation does not interfere with the ability of MURC to interact with endogenous cardiac STIM1 or its ERM domain.

We next investigated the influence of the R140W mutation on the activation of SOCE in NRVM. Article 1 Figures 5D and 5E show the average Ca^{2+} transient and the average Ca^{2+} entry in NRVM overexpressing either β Gal (black line), wild-type MURC (blue line), or the R140W-MURC mutant (yellow line), respectively. Remarkably, R140W-MURC overexpression in NRVM greatly increased SOCE (144.0 ± 53.2 nM) to levels that were 11.5- and 5.1-fold higher than the β Gal and MURC conditions, respectively. To further investigate the effect of the R140W-MURC mutant on SOCE, we assessed the early Ca^{2+} entry rate after Ca^{2+} readdition by linear regression fitting using Graphpad Prism 7

software (Article 1 Figure 5F). The calculated early Ca^{2+} entry rates after Ca^{2+} readdition were 0.20 ± 0.01 nM/s, 0.69 ± 0.02 nM/s, and 10.1 ± 0.22 nM/s for βGal (black line), MURC (blue line), and R140W-MURC (yellow line), respectively. These results show that the R140W substitution in MURC potentiates its effect on both early and global SOCE-mediated Ca^{2+} entry.



Article 1 Figure 5. The R140W missense variant of MURC potentiates the effect on SOCE-mediated Ca^{2+} entry in NRVM. (A) Protein lysates purified from adult rat hearts were GST pulled down with GST alone, GST-fused with wild-type hMURC (GST-MURC), or MURC containing the R140W mutation (GST-R140W). The interaction of endogenous STIM1 with the GST-MURC fusion protein and endogenous STIM1 expression in a whole heart protein lysate (WHL) were evaluated by immunoblotting (IB). (B) Forty-eight hours after infection with a control βGal , MURC, or R140W adenovirus, the NRVM were lysed and the protein lysates were GST pulled down with GST alone or with GST-ERM as bait. The interaction of the MURC proteins with GST or GST-ERM was evaluated by immunoblotting (IB). (C) Forty-eight hours after the infection with a control βGal , MURC, or R140W adenovirus, NRVMs were lysed and MURC proteins overexpression was evaluated by immunoblotting (IB). (D) The same Ca^{2+} imaging protocol shown in Figure 4 was performed to compare the impact of the overexpression of the R140W-MURC mutant (R140W) (yellow line) on the average Ca^{2+} transient compared to the impact of the overexpression of βGal (black line) and wild-type MURC (MURC) (blue line). (E) Average Ca^{2+} entry values from the SOCE protocol shown in panel D. (F) Linear regression fitting of early Ca^{2+} entry values after the Ca^{2+} readdition as depicted in panel D with their respective slopes. The linear equations obtained from the regression fitting were $y = 0.2033x + 87.3$ for βGal , $y = 0.6922x + 90.17$ for MURC, and $y = 10.1x + 81.01$ for R140W. The values in the bar graphs represent the means \pm standard deviations of Ca^{2+} entry from at least four independent cell isolations ($n \geq 4$). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ using an unpaired Student's t-test).

4. Discussion

SOCE in cardiomyocytes has long been ignored because a large Ca^{2+} influx caused by cardiac EC coupling occurs with each heartbeat. Many reports have shown that STIM1, an endo/sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} sensor involved in the activation of SOCE, is expressed in cardiomyocytes [7–9,32]. These studies have also shown that STIM1 is essential for the Ca^{2+} -dependent development of cardiac hypertrophy. However, the exact role of STIM1 in cardiomyocytes is unknown. In the present study, we identified MURC/Cavin-4 as a new STIM1-interacting protein and showed that the overexpression of MURC in cardiomyocytes enhances SOCE. The MURC protein expression is restricted in cardiac and skeletal muscle tissues. It is localized in the plasma membrane and Z-line-associated protein and exhibits an overlapping distribution with caveolin-3 (Cav-3) [31,33–35]. The Cav-3 protein is essential for the formation of caveolae in cardiomyocytes [36–38]. Caveolae are important for the localization and functioning of cardiac ion channels. Cav-3 allows these channels to integrate into specific signaling complexes in distinct cell surface locations. For example, GPCRs and G-proteins co-localize with Cav3 and regulate L-type Ca^{2+} channels in cardiomyocytes [37]. Furthermore, many studies have shown that the SOCE-involved channels Orai1 and TRPC localize in caveolae in different cell types [39–43].

The MURC protein shares two homology domains with two cavin family helical regions (HR1 and HR2) and three non-homologue/disordered regions (DR1, DR2, and DR3) [28–

30]. Our results show that the ERM domain of STIM1 interacts with the HR1/DR2 domains of MURC. It was previously reported that the N-terminals of HR1 domains oligomerize into a trimeric coiled-coil structure [30]. The crystal structure of the HR1 domain of cavin1 has a conserved basic surface at the C-terminus, while the crystal structure of the SOAR domain of STIM1, which is part of the ERM domain, has a positively charged surface [44]. The SOAR domain also binds other proteins, including SPPL3 [44] and SARAF [19,45]. We thus believe that MURC may interact with STIM1 via the charged residues of the SOAR domain.

Our results show that overexpressing MURC in cardiomyocytes significantly increases SOCE. When cardiomyocytes are stimulated, STIM1 oligomerizes into clusters and translocates close to the plasma membrane to interact with Orai and activate SOCE (Article 1 Figure 4 and [46–49]). However, when MURC was overexpressed, the interaction between STIM1 and MURC was not enhanced by TG/caffeine-induced store depletion (data not shown). Rather, the overexpression of MURC in cardiomyocytes caused an increase in the interaction between STIM1 and Orai1 in the unstimulated condition, which was not regulated by TG/caffeine-induced store depletion. As such, when STIM1 and Orai1 are precoupled, the initial rate of Ca^{2+} entry increases, which results in an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Rodriguez et al. [31] identified many single-nucleotide polymorphisms in the gene encoding MURC that are associated with dilated cardiomyopathy and hypertrophic cardiomyopathy. Ca^{2+} signaling defects have also been found in various forms of heart failure, including dilated cardiomyopathy [50–54]. One of the mutations in MURC, R140W, is located at the C-terminal end of the HR1 domain. Our results show that the overexpression of the R140W-MURC mutant enhances SOCE 11.47- and 5.12-fold compared to the β Gal and MURC conditions, respectively. On the other hand, the R140W mutation does not enhance the capacity of MURC to activate RhoA [31]. The cardiomyopathy caused by the R140W-MURC mutant may thus be due to an increase in Ca^{2+} entry upon store depletion, which can result in a Ca^{2+} overload in cells and impair their function. In conclusion, since MURC is an important component of the caveola structure, it might serve as an anchor for STIM1. This would stabilize the junction between

the endoplasmic reticulum and the plasma membrane, which in turn would allow more efficient coupling between STIM1 and Orai1.

Acknowledgements

None to declare.

Funding sources

This study was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) [grant number 436248-2013 awarded to M.A.M, and grant number 355729-2013 awarded to G.B.], a Centre de Recherche Médicale de l'Université de Sherbrooke (CRMUS) graduate student research award [awarded to J.M.], a Fonds de recherche du Québec–Santé (FRQS) Doctoral training award [awarded to J.D.], an Institut de pharmacologie de Sherbrooke (IPS) graduate student research award, an FRQS Master's training award, a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Frederick Banting and Charles Best graduate scholarship, and an FRQS doctoral training award [all awarded to H.G.], a André-Lussier Research Chair [awarded to J.-L.P.], and FRQS-Junior 1 and Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC) New Investigator awards [both awarded to M.A.-M.].

Authors' contributions

J.M., J.D., H.G., and J.B. performed the experiments; J.M. and J.D. analyzed the results; J.M., J.D., J.-L.P., M.A.-M., and G.B. designed the project; J.M., M.A.-M. and G.B. wrote the original draft of the manuscript, and all the authors reviewed and edited the final version of the manuscript.

Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

References

- [1] M.J. Berridge, Remodelling Ca^{2+} signalling systems and cardiac hypertrophy, *Biochem. Soc. Trans.* 34 (2006) 228–231. doi:10.1042/BST20060228.
- [2] C.J. Fearnley, H.L. Roderick, M.D. Bootman, Calcium signaling in cardiac myocytes, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3 (2011) a004242. doi:10.1101/cshperspect.a004242.
- [3] A. Fabiato, Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum, *Am. J. Physiol.* 245 (1983) C1–14. doi:10.1152/ajpcell.1983.245.1.C1.
- [4] N. Frey, T.A. McKinsey, E.N. Olson, Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function, *Nat. Med.* 6 (2000) 1221–1227. doi:10.1038/81321.
- [5] J. Avila-Medina, I. Mayoral-Gonzalez, A. Dominguez-Rodriguez, I. Gallardo-Castillo, J. Ribas, A. Ordoñez, J.A. Rosado, T. Smani, The Complex Role of Store Operated Calcium Entry Pathways and Related Proteins in the Function of Cardiac, Skeletal and Vascular Smooth Muscle Cells, *Front Physiol.* 9 (2018) 257. doi:10.3389/fphys.2018.00257.
- [6] H.E. Collins, X. Zhu-Mauldin, R.B. Marchase, J.C. Chatham, STIM1/Orai1-mediated SOCE: current perspectives and potential roles in cardiac function and pathology, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 305 (2013) H446–458. doi:10.1152/ajpheart.00104.2013.
- [7] X. Luo, B. Hojaye, N. Jiang, Z.V. Wang, S. Tandan, A. Rakalin, B.A. Rothermel, T.G. Gillette, J.A. Hill, STIM1-dependent store-operated Ca^{2+} entry is required for pathological cardiac hypertrophy, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52 (2012) 136–147. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.11.003.
- [8] T. Ohba, H. Watanabe, M. Murakami, T. Sato, K. Ono, H. Ito, Essential role of STIM1 in the development of cardiomyocyte hypertrophy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389 (2009) 172–176. doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.117.
- [9] M. Voelkers, M. Salz, N. Herzog, D. Frank, N. Dolatabadi, N. Frey, N. Gude, O. Friedrich, W.J. Koch, H.A. Katus, M.A. Sussman, P. Most, Orai1 and Stim1 regulate normal and hypertrophic growth in cardiomyocytes, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48 (2010) 1329–1334. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.01.020.
- [10] J. Liou, M.L. Kim, W.D. Heo, J.T. Jones, J.W. Myers, J.E. Ferrell, T. Meyer, STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx, *Curr. Biol.* 15 (2005) 1235–1241. doi:10.1016/j.cub.2005.05.055.
- [11] J. Roos, P.J. DiGregorio, A.V. Yeromin, K. Ohlsen, M. Lioudyno, S. Zhang, O. Safrina, J.A. Kozak, S.L. Wagner, M.D. Cahalan, G. Velicelebi, K.A. Stauderman, STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function, *J. Cell Biol.* 169 (2005) 435–445. doi:10.1083/jcb.200502019.
- [12] J. Liou, M. Fivaz, T. Inoue, T. Meyer, Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca^{2+} store depletion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007) 9301–9306. doi:10.1073/pnas.0702866104.
- [13] M.M. Wu, J. Buchanan, R.M. Luik, R.S. Lewis, Ca^{2+} store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane, *J. Cell Biol.* 174 (2006) 803–813. doi:10.1083/jcb.200604014.
- [14] S.L. Zhang, Y. Yu, J. Roos, J.A. Kozak, T.J. Deerinck, M.H. Ellisman, K.A. Stauderman, M.D. Cahalan, STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane, *Nature.* 437 (2005) 902–905. doi:10.1038/nature04147.

- [15] N. Nguyen, M. Biet, E. Simard, E. Béliveau, N. Francoeur, G. Guillemette, R. Dumaine, M. Grandbois, G. Boulay, STIM1 participates in the contractile rhythmicity of HL-1 cells by moderating T-type Ca(2+) channel activity, *Biochim. Biophys. Acta.* 1833 (2013) 1294–1303. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.02.027.
- [16] C.Y. Park, A. Shcheglovitov, R. Dolmetsch, The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels, *Science.* 330 (2010) 101–105. doi:10.1126/science.1191027.
- [17] Y. Wang, X. Deng, S. Mancarella, E. Hendron, S. Eguchi, J. Soboloff, X.D. Tang, D.L. Gill, The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels, *Science.* 330 (2010) 105–109. doi:10.1126/science.1191086.
- [18] J. Jing, L. He, A. Sun, A. Quintana, Y. Ding, G. Ma, P. Tan, X. Liang, X. Zheng, L. Chen, X. Shi, S.L. Zhang, L. Zhong, Y. Huang, M.-Q. Dong, C.L. Walker, P.G. Hogan, Y. Wang, Y. Zhou, Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca²⁺ influx, *Nat. Cell Biol.* 17 (2015) 1339–1347. doi:10.1038/ncb3234.
- [19] A. Jha, M. Ahuja, J. Maléth, C.M. Moreno, J.P. Yuan, M.S. Kim, S. Muallem, The STIM1 CTID domain determines access of SARAF to SOAR to regulate Orai1 channel function, *J. Cell Biol.* 202 (2013) 71–79. doi:10.1083/jcb.201301148.
- [20] R. Palty, A. Raveh, I. Kaminsky, R. Meller, E. Reuveny, SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling, *Cell.* 149 (2012) 425–438. doi:10.1016/j.cell.2012.01.055.
- [21] L. Albarran, J.J. Lopez, N.B. Amor, F.E. Martin-Cano, A. Berna-Erro, T. Smani, G.M. Salido, J.A. Rosado, Dynamic interaction of SARAF with STIM1 and Orai1 to modulate store-operated calcium entry, *Sci Rep.* 6 (2016) 24452. doi:10.1038/srep24452.
- [22] S.L. Makowski, Z. Wang, J.L. Pomerantz, A protease-independent function for SPPL3 in NFAT activation, *Mol. Cell. Biol.* 35 (2015) 451–467. doi:10.1128/MCB.01124-14.
- [23] G. Grynkiewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien, A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 3440–3450.
- [24] L. Bénard, J.G. Oh, M. Cacheux, A. Lee, M. Nonnenmacher, D.S. Matasic, E. Kohlbrenner, C. Kho, C. Pavoine, R.J. Hajjar, J.-S. Hulot, Cardiac Stim1 Silencing Impairs Adaptive Hypertrophy and Promotes Heart Failure Through Inactivation of mTORC2/Akt Signaling, *Circulation.* 133 (2016) 1458–1471; discussion 1471. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020678.
- [25] R.N. Correll, S.A. Goonasekera, J.H. van Berlo, A.R. Burr, F. Accornero, H. Zhang, C.A. Makarewich, A.J. York, M.A. Sargent, X. Chen, S.R. Houser, J.D. Molkentin, STIM1 elevation in the heart results in aberrant Ca²⁺ handling and cardiomyopathy, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 87 (2015) 38–47. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.07.032.
- [26] C. Parks, M.A. Alam, R. Sullivan, S. Mancarella, STIM1-dependent Ca(2+) microdomains are required for myofilament remodeling and signaling in the heart, *Sci Rep.* 6 (2016) 25372. doi:10.1038/srep25372.
- [27] B. Zhang, J. Jiang, Z. Yue, S. Liu, Y. Ma, N. Yu, Y. Gao, S. Sun, S. Chen, P. Liu, Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE) contributes to angiotensin II-induced cardiac fibrosis in cardiac fibroblasts, *J. Pharmacol. Sci.* 132 (2016) 171–180. doi:10.1016/j.jphs.2016.05.008.
- [28] S. Gustincich, P. Vatta, S. Goruppi, M. Wolf, S. Saccone, G. Della Valle, M. Baggiolini, C. Schneider, The human serum deprivation response gene (SDPR) maps

- to 2q32-q33 and codes for a phosphatidylserine-binding protein, *Genomics*. 57 (1999) 120–129. doi:10.1006/geno.1998.5733.
- [29] O. Kovtun, V.A. Tillu, N. Ariotti, R.G. Parton, B.M. Collins, Cavin family proteins and the assembly of caveolae, *J. Cell. Sci.* 128 (2015) 1269–1278. doi:10.1242/jcs.167866.
- [30] O. Kovtun, V.A. Tillu, W. Jung, N. Leneva, N. Ariotti, N. Chaudhary, R.A. Mandyam, C. Ferguson, G.P. Morgan, W.A. Johnston, S.J. Harrop, K. Alexandrov, R.G. Parton, B.M. Collins, Structural insights into the organization of the cavin membrane coat complex, *Dev. Cell*. 31 (2014) 405–419. doi:10.1016/j.devcel.2014.10.002.
- [31] G. Rodriguez, T. Ueyama, T. Ogata, G. Czernuszewicz, Y. Tan, G.W. Dorn, R. Bogaev, K. Amano, H. Oh, H. Matsubara, J.T. Willerson, A.J. Marian, Molecular genetic and functional characterization implicate muscle-restricted coiled-coil gene (MURC) as a causal gene for familial dilated cardiomyopathy, *Circ Cardiovasc Genet*. 4 (2011) 349–358. doi:10.1161/CIRCGENETICS.111.959866.
- [32] J.-S. Hulot, J. Fauconnier, D. Ramanujam, A. Chaanine, F. Aubart, Y. Sassi, S. Merkle, O. Cazorla, A. Ouillé, M. Dupuis, L. Hadri, D. Jeong, S. Mühlstedt, J. Schmitt, A. Braun, L. Bénard, Y. Saliba, B. Laggerbauer, B. Nieswandt, A. Lacampagne, R.J. Hajjar, A.-M. Lompré, S. Engelhardt, Critical role for stromal interaction molecule 1 in cardiac hypertrophy, *Circulation*. 124 (2011) 796–805. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.031229.
- [33] T. Ogata, T. Ueyama, K. Isodono, M. Tagawa, N. Takehara, T. Kawashima, K. Harada, T. Takahashi, T. Shioi, H. Matsubara, H. Oh, MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein that modulates the Rho/ROCK pathway, induces cardiac dysfunction and conduction disturbance, *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 3424–3436. doi:10.1128/MCB.02186-07.
- [34] M. Tagawa, T. Ueyama, T. Ogata, N. Takehara, N. Nakajima, K. Isodono, S. Asada, T. Takahashi, H. Matsubara, H. Oh, MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein, is involved in the regulation of skeletal myogenesis, *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 295 (2008) C490–498. doi:10.1152/ajpcell.00188.2008.
- [35] M. Bastiani, L. Liu, M.M. Hill, M.P. Jedrychowski, S.J. Nixon, H.P. Lo, D. Abankwa, R. Luetterforst, M. Fernandez-Rojo, M.R. Breen, S.P. Gygi, J. Vinten, P.J. Walser, K.N. North, J.F. Hancock, P.F. Pilch, R.G. Parton, MURC/Cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar complexes, *J. Cell Biol.* 185 (2009) 1259–1273. doi:10.1083/jcb.200903053.
- [36] R.C. Balijepalli, T.J. Kamp, Caveolae, ion channels and cardiac arrhythmias, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 98 (2008) 149–160. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2009.01.012.
- [37] R.C. Balijepalli, J.D. Foell, D.D. Hall, J.W. Hell, T.J. Kamp, Localization of cardiac L-type Ca(2+) channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for beta(2)-adrenergic regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 7500–7505. doi:10.1073/pnas.0503465103.
- [38] F. Galbiati, J.A. Engelman, D. Volonte, X.L. Zhang, C. Minetti, M. Li, H. Hou, B. Kneitz, W. Edelmann, M.P. Lisanti, Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 21425–21433. doi:10.1074/jbc.M100828200.
- [39] Y.S. Prakash, M.A. Thompson, B. Vaa, I. Matabdin, T.E. Peterson, T. He, C.M. Pabelick, Caveolins and intracellular calcium regulation in human airway smooth

- muscle, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 293 (2007) L1118–1126. doi:10.1152/ajplung.00136.2007.
- [40] V. Sathish, A.J. Abcejo, M.A. Thompson, G.C. Sieck, Y.S. Prakash, C.M. Pabelnick, Caveolin-1 regulation of store-operated Ca(2+) influx in human airway smooth muscle, *Eur. Respir. J.* 40 (2012) 470–478. doi:10.1183/09031936.00090511.
- [41] M. Isshiki, R.G.W. Anderson, Function of caveolae in Ca²⁺ entry and Ca²⁺-dependent signal transduction, *Traffic* 4 (2003) 717–723.
- [42] R.M. Shaw, H.M. Colecraft, L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes, *Cardiovasc. Res.* 98 (2013) 177–186. doi:10.1093/cvr/cvt021.
- [43] A. Bohórquez-Hernández, E. Gratton, J. Pacheco, A. Asanov, L. Vaca, Cholesterol modulates the cellular localization of Orai1 channels and its disposition among membrane domains, *Biochim. Biophys. Acta.* 1862 (2017) 1481–1490. doi:10.1016/j.bbalip.2017.09.005.
- [44] X. Yang, H. Jin, X. Cai, S. Li, Y. Shen, Structural and mechanistic insights into the activation of Stromal interaction molecule 1 (STIM1), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (2012) 5657–5662. doi:10.1073/pnas.1118947109.
- [45] L. Albarrán, J.J. López, L.J. Gómez, G.M. Salido, J.A. Rosado, SARAF modulates TRPC1, but not TRPC6, channel function in a STIM1-independent manner, *Biochem. J.* 473 (2016) 3581–3595. doi:10.1042/BCJ20160348.
- [46] C.Y. Park, P.J. Hoover, F.M. Mullins, P. Bachhawat, E.D. Covington, S. Raunser, T. Walz, K.C. Garcia, R.E. Dolmetsch, R.S. Lewis, STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1, *Cell* 136 (2009) 876–890. doi:10.1016/j.cell.2009.02.014.
- [47] R.M. Luik, M.M. Wu, J. Buchanan, R.S. Lewis, The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions, *J. Cell Biol.* 174 (2006) 815–825. doi:10.1083/jcb.200604015.
- [48] P. Xu, J. Lu, Z. Li, X. Yu, L. Chen, T. Xu, Aggregation of STIM1 underneath the plasma membrane induces clustering of Orai1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350 (2006) 969–976. doi:10.1016/j.bbrc.2006.09.134.
- [49] L. Navarro-Borelly, A. Somasundaram, M. Yamashita, D. Ren, R.J. Miller, M. Prakriya, STIM1-Orai1 interactions and Orai1 conformational changes revealed by live-cell FRET microscopy, *J. Physiol. (Lond.)* 586 (2008) 5383–5401. doi:10.1113/jphysiol.2008.162503.
- [50] Y. Iwata, Y. Katayama, Y. Okuno, S. Wakabayashi, Novel inhibitor candidates of TRPV2 prevent damage of dystrophic myocytes and ameliorate against dilated cardiomyopathy in a hamster model, *Oncotarget* 9 (2018) 14042–14057. doi:10.18632/oncotarget.24449.
- [51] Y. Iwata, H. Ohtake, O. Suzuki, J. Matsuda, K. Komamura, S. Wakabayashi, Blockade of sarcolemmal TRPV2 accumulation inhibits progression of dilated cardiomyopathy, *Cardiovasc. Res.* 99 (2013) 760–768. doi:10.1093/cvr/cvt163.
- [52] A.S. Barth, R. Kuner, A. Bunes, M. Ruschhaupt, S. Merk, L. Zwermann, S. Kääh, E. Kreuzer, G. Steinbeck, U. Mansmann, A. Poustka, M. Nabauer, H. Sülthmann, Identification of a common gene expression signature in dilated cardiomyopathy across independent microarray studies, *J. Am. Coll. Cardiol.* 48 (2006) 1610–1617. doi:10.1016/j.jacc.2006.07.026.
- [53] R. Caballero, R. Gómez, I. Moreno, L. Nuñez, T. González, C. Arias, M. Guizy, C. Valenzuela, J. Tamargo, E. Delpón, Interaction of angiotensin II with the angiotensin

- type 2 receptor inhibits the cardiac transient outward potassium current, *Cardiovasc. Res.* 62 (2004) 86–95. doi:10.1016/j.cardiores.2003.12.029.
- [54] Y. Yamada, H. Kinoshita, K. Kuwahara, Y. Nakagawa, Y. Kuwabara, T. Minami, C. Yamada, J. Shibata, K. Nakao, K. Cho, Y. Arai, S. Yasuno, T. Nishikimi, K. Ueshima, S. Kamakura, M. Nishida, S. Kiyonaka, Y. Mori, T. Kimura, K. Kangawa, K. Nakao, Inhibition of N-type Ca^{2+} channels ameliorates an imbalance in cardiac autonomic nerve activity and prevents lethal arrhythmias in mice with heart failure, *Cardiovasc. Res.* 104 (2014) 183–193. doi:10.1093/cvr/cvu185.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Validation de l'interaction entre STIM1 et MURC

Lors de précédents travaux publiés au sein du laboratoire du Pr Boulay (Nguyen *et al*, 2013), nous avons mis en lumière un rôle cellulaire de la protéine STIM1 chez les cardiomyocytes dans un cadre physiologique. Ce rôle cellulaire de STIM1 l'implique dans la régulation du routage cellulaire du T-VDCC $\text{Ca}_v3.1$ par son interaction avec ce canal calcique. Nous avons ensuite émis l'hypothèse que STIM1 possède des partenaires d'interaction impliqués dans son transport cellulaire et que ces protéines régulent son activité dans les cardiomyocytes. Afin d'identifier de nouveaux partenaires d'interaction potentiels de STIM1 dans les cardiomyocytes, nous avons effectué des expériences de *GST-pulldowns* couplées à la spectrométrie de masse. Lors de ces expérimentations, la protéine MURC est un candidat qui a attiré notre attention puisqu'elle participe à la formation des cavéoles et qu'elle est impliquée dans plusieurs voies de signalisations cellulaires (Ogata *et al*, 2008, 2014).

Dans le cœur, l'expression de MURC se retrouve majoritairement dans les cardiomyocytes (Ogata *et al*, 2008). Nous avons émis l'hypothèse que STIM1 pouvait interagir avec MURC dans les cardiomyocytes. Nos résultats montrent que le domaine ERM de STIM1 est suffisant pour interagir avec MURC lorsqu'il est surexprimé dans les NRVM (Article 1 Figures 1B, 2D et 5B). Nos résultats n'excluent pas la possibilité que la forme endogène de MURC puisse interagir avec le domaine ERM de STIM1. Nous n'avons pas été capables de détecter avec confiance l'expression endogène de MURC par immunobuvardage même si l'ARNm de cette protéine est bien exprimé dans les NRVM (Ogata *et al*, 2008). De plus, nos résultats indiquent que MURC peut interagir de manière spécifique avec le domaine ERM de STIM1 dans les NRVM puisque l'intensité de la détection de MURC dans le précipitat GST-ERM comparée à celle du précipitat GST est beaucoup plus importante.

Nos résultats montrent que MURC possède la capacité à interagir avec la forme complète de STIM1 dans le cœur (Article 1 Figure 1C, 2B, 2C et 5A). Puisque l'expression

de MURC dans le cœur se retrouve majoritairement dans les cardiomyocytes, l'interaction entre MURC et STIM1 s'effectue vraisemblablement dans ce type cellulaire. De plus, la détection de trois bandes majoritaires a été observée pour la protéine de fusion GST-MURC. Le poids théorique de GST-MURC est de 68 kDa ce qui correspond à la bande détectée qui a le plus haut poids moléculaire. Les deux autres bandes correspondent probablement à des formes de GST-MURC qui n'ont pas été traduits complètement. Il est possible qu'un mauvais repliement de ceux-ci ait provoqué la terminaison de leur traduction. Puisque les ribosomes des bactéries qui ont été employées pour produire les protéines de fusion GST ont la capacité de reconnaître les codons eucaryotes, la terminaison de la traduction induite par l'absence d'une reconnaissance de codons eucaryotes est improbable. Nos résultats suggèrent que ce sont des codons situés dans la portion C-terminale de MURC qui n'ont pas été traduits étant donné que la protéine GST se situe dans la portion N-terminale de la protéine GST-MURC et que la protéine GST a été détectée dans les immunobuvardages. Ces observations suggèrent que la portion N-terminale de MURC puisse être suffisante pour interagir avec STIM1 dans les cardiomyocytes. Cependant, il est possible que des composantes et des résidus de la portion C-terminale de MURC participent à l'interaction entre MURC et STIM1.

Nos résultats ne nous permettent pas de valider que l'interaction entre MURC et STIM1 est directe. Nous pourrions effectuer des *GST-pulldowns* avec les protéines purifiées afin de clarifier cette information. Il est possible que cette interaction soit indirecte et nécessite la présence de protéines d'échafaudage. Parmi les protéines candidates, les autres composantes des cavéoles pourraient assurer ce rôle puisque plusieurs protéines associées à la signalisation calcique y sont localisées (Pani et Singh, 2009). La protéine Cav1 pourrait favoriser cette interaction puisqu'elle est un partenaire d'interaction de STIM1 et qu'elle est requise pour la formation des cavéoles (Hansen et Nichols, 2010; Pani *et al*, 2009). Les protéines Cav3 et SDPR/cavin2 pourraient assurer ce rôle puisqu'elles sont exprimées dans les cardiomyocytes et interagissent avec MURC (Faggi *et al*, 2015; Naito *et al*, 2015; Ogata *et al*, 2008). Par des essais de perte de fonctions comme la surexpression de shRNA, nous pourrions vérifier si les protéines Cav1, Cav3 et SDPR influencent l'interaction cellulaire entre MURC et STIM1.

De plus, ces résultats démontrent que les protéines STIM1 et MURC peuvent interagir *in vitro*, mais ne garantissent pas qu'elles sont des partenaires *in cellulo* et *in vivo*. Afin de valider davantage cette interaction au point de vue cellulaire, il serait intéressant d'effectuer des expériences de coimmunoprécipitations, d'immunofluorescences et des essais de proximité du type APEX couplés à la spectrométrie de masse (Hung *et al*, 2016). Bien que des essais de proximité du type APEX ont été accomplis avec STIM1, ceux-ci ont été effectués dans une lignée cellulaire embryonnaire rénale (HEK) où les cavéoles sont peu abondantes (Jing *et al*, 2015). Il serait intéressant d'accomplir ces expérimentations chez des cardiomyocytes où l'on pourrait évaluer le dynamisme moléculaire de l'interaction entre MURC et STIM1 dans des conditions basales et dans des conditions où le SOCE est activé.

En somme, ces résultats démontrent une première évidence que la protéine STIM1 peut interagir avec les composantes des cavéoles dans les cardiomyocytes. De plus, l'interaction entre la région N-terminale de MURC et le domaine ERM de STIM1 dans le cœur et les cardiomyocytes met en lumière le rôle potentiel de MURC et des cavéoles dans la régulation du SOCE, un mécanisme dans lequel STIM1 est le régulateur principal.

Domaines d'interaction entre STIM1 et MURC

Nous avons cherché à identifier les domaines de MURC impliqués dans son interaction avec STIM1 afin de cibler les mécanismes moléculaires potentiels par lesquels MURC modulerait l'activité de STIM1. Nous avons identifié que le domaine ERM de STIM1 était suffisant pour médier son interaction avec MURC (Article 1 Figures 1B, 2D et 5B). Il serait intéressant d'identifier les sous-domaines et les résidus de ce domaine impliqués dans cette interaction. De cette manière, l'élucidation de mécanismes moléculaires par lesquels MURC régulerait l'activité de STIM1 basés sur les sous-domaines et les résidus nécessaires à leur interaction pourrait être accomplie. Des essais de liaison impliquant MURC avec les protéines STIM1L et STIM2 pourraient être effectués afin de cibler ces domaines et résidus. D'une part, nous pourrions vérifier si MURC interagit avec les autres membres de la famille de protéines STIM. D'autre part, nous pourrions évaluer l'impact de l'*actin binding domain* que STIM1L possède sur la liaison

entre la protéine MURC et STIM1. Ces observations permettraient d'identifier des acides aminés conservés entre les membres de la famille des STIM possiblement impliqués dans leur interaction avec MURC.

Nos résultats montrent que les domaines DR1/HR1, HR1/DR2 et DR2/HR2 de MURC, lorsque ceux-ci sont exprimés de manière séparée, sont suffisants pour interagir avec STIM1 par *GST-Pulldown* (Article 1 Figure 2B). L'absence d'interaction entre les domaines HR2/DR3 de MURC et STIM1 indique que le domaine DR3 n'est probablement pas impliqué dans cette interaction. De plus, ces observations viennent appuyer l'hypothèse que la portion N-terminale de MURC est suffisante pour assurer son interaction avec STIM1 puisque le domaine DR3 de MURC ne semble pas requis. Puisqu'ils ont la capacité d'interagir avec la protéine STIM1 lorsque ceux-ci sont exprimés avec l'un de leur domaine adjacent, les domaines HR1 et DR2 de MURC sont possiblement les domaines principaux impliqués dans l'interaction de cette protéine avec STIM1. On ne peut pas exclure l'importance des domaines DR1 et HR2 de MURC dans cette interaction puisque STIM1 a été détecté dans les précipitats des protéines de fusion GST contenant ces domaines. Cependant, nos résultats ne permettent pas d'identifier un domaine précis de la protéine MURC qui est nécessaire dans son interaction avec la protéine STIM1. De plus, le repliement des protéines de fusion GST-MURC peut être différent de celui de la protéine complète lorsqu'une forme partielle est exprimée ce qui influencerait leur capacité à interagir avec la forme endogène de STIM1. Il est possible que plusieurs sites d'interaction entre ces deux protéines existent afin de stabiliser la liaison entre MURC et STIM1 ce qui expliquerait pourquoi plusieurs domaines de MURC ont été capables d'interagir avec STIM1.

Parmi les domaines de MURC pouvant interagir avec STIM1, nous nous sommes concentrés sur le domaine HR1 puisqu'il est important pour sa trimérisation, sa localisation cellulaire et son interaction avec les phospholipides membranaires (Kovtun *et al*, 2014; Naito *et al*, 2015). De plus, aucune fonction précise n'a été définie pour les domaines DR1 et DR2. Il a été suggéré que le domaine HR2 des cavins puisse interagir avec les phospholipides de la membrane plasmique de manière coopérative suivant l'interaction du domaine HR1 avec ceux-ci (Kovtun *et al*, 2014). Nous avons donc émis l'hypothèse que le

domaine HR1 de MURC est important pour que cette protéine puisse interagir avec STIM1. Nos résultats démontrent une perte d'interaction entre MURC et STIM1 lorsque le domaine HR1 de MURC a été tronqué de cette protéine (Article 1 Figures 2C et 2D). Il est possible que des résidus compris dans les domaines DR1 et DR2 situés à proximité du domaine HR1 contribuent à stabiliser la conformation en hélice α de HR1 et que ces résidus à eux seuls ne peuvent pas assurer l'interaction entre MURC et STIM1. De plus, la fusion des domaines DR1 et DR2 chez les protéines GST- Δ HR1 et MURC- Δ HR1 peut imposer une structure alternative à ces domaines. En effet, ces deux domaines ont des caractéristiques acides ce peut qui influencer directement la capacité de ces mutants de troncation à interagir avec STIM1. Ensemble, ces résultats indiquent que le domaine HR1 de MURC est la région protéique principalement impliquée dans l'interaction avec STIM1 et que les domaines DR1, DR2 et HR2 sont possiblement des sites d'interaction secondaires qui permettent de stabiliser la liaison entre les deux protéines.

Il serait intéressant de générer une protéine qui possède uniquement le domaine HR1 de MURC afin d'évaluer si celui-ci est suffisant pour interagir avec la protéine STIM1. Il serait ensuite pertinent de déterminer le motif d'interaction minimal par des essais de liaison en employant d'autres mutants de troncation et des substitutions d'acides aminés par des alanines. L'absence des domaines DR1, DR2 et HR2 dans ces expérimentations permettrait également de clarifier leur rôle et leur nécessité dans l'interaction entre MURC et STIM1.

Potentialisation du SOCE dans les NRVMs médiée par la surexpression de MURC

Après avoir validé l'interaction entre MURC et STIM1 *in vitro*, nous avons émis l'hypothèse que MURC pouvait réguler l'activité de STIM1. Étant donné que STIM1 est la pierre angulaire de la régulation du SOCE dans plusieurs types cellulaires, nous avons cherché à déterminer l'impact de MURC sur la régulation du SOCE dans les NRVM par une approche de gain de fonction. Dans un premier temps, nous avons validé la présence de SOCE dans notre modèle cellulaire en réduisant de manière importante ce type d'entrée calcique par l'utilisation de deux inhibiteurs non sélectifs du SOCE, le 2-APB et le SKF-96365 (Article 1 Figures 3A, 3D et 5D). De plus, ces résultats sont en accord avec la

littérature (Luo *et al*, 2012; Uehara *et al*, 2002). De plus, l'augmentation de l'interaction entre Orai1 et STIM1 suite à l'activation du SOCE par la TG et la caféine (Article Figures 4C et 4D) comparativement aux conditions non stimulées supporte que la machinerie SOCE est fonctionnelle dans notre cadre expérimental. Nous avons ensuite démontré que la surexpression de MURC potentialise le SOCE dans les cardiomyocytes puisqu'elle est grandement réduite en présence des inhibiteurs 2-APB et SKF-96365 (Article 1 Figures 3B, 3C, 3D, 5D et 5E). De plus, l'entrée calcique observée lorsque MURC est surexprimée est plus rapide que la condition contrôle (Article 1 Figure 5F). Cette augmentation de la vitesse d'entrée calcique est associée à une augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux ioniques impliqués dans le SOCE (Sharma *et al*, 2013). Ces résultats suggèrent que les composantes impliquées dans l'activation du SOCE sont à proximité les unes des autres en condition basale lorsque MURC est surexprimée. De cette manière, l'activation du SOCE est plus efficace suivant une vidange de Ca^{2+} du RS. Cette affirmation est supportée par l'augmentation de l'interaction entre STIM1 et Orai1 en condition basale lorsque MURC est surexprimé (Article Figures 4C et 4D). Afin de vérifier si la surexpression de MURC augmente réellement la probabilité d'ouverture des canaux ioniques impliqués dans le SOCE, il serait intéressant d'effectuer des essais d'électrophysiologie pour évaluer l'impact de la protéine MURC sur les courants I_{CRAC} et I_{SOC} . Toutefois, la surexpression de MURC n'influence pas l'augmentation de l'interaction entre Orai1 et STIM1 suivant l'activation du SOCE par la TG et la caféine. De plus, la surexpression de MURC dans les NRVM en absence de relâche de Ca^{2+} lors d'expériences d'imagerie calcique n'a pas provoqué une entrée calcique lors de la réintroduction de Ca^{2+} en fin de protocole (résultats non divulgués). Ces résultats suggèrent que MURC régule le transport cellulaire de la protéine STIM1 en l'amenant à proximité des canaux calciques impliqués dans le SOCE sans toutefois l'activer.

Les inhibiteurs du SOCE employés lors de ces expérimentations d'imagerie calcique sont non sélectifs au SOCE ayant des cibles communes tels les canaux SOC (Bootman *et al*, 2002; Merritt *et al*, 1990). Aux concentrations employées dans les protocoles d'imagerie calcique, le 2-APB a été décrit comme étant un activateur du canal Orai3 tandis que le SKF-96365 l'inhibe (Schindl *et al*, 2008). Puisque l'entrée calcique est

grandement diminuée en présence de 2-APB, ces résultats indiquent que l'entrée calcique de type SOCE n'est pas médiée par l'activation du canal Orai3 seul.

Un des mécanismes par lequel MURC pourrait potentialiser le SOCE est l'altération du contenu en Ca^{2+} dans le RS. Une diminution de la concentration du Ca^{2+} dans le RS associée à la surexpression de MURC favoriserait l'activation du SOCE. Cependant, l'effet de la surexpression de MURC sur le SOCE n'est pas dû à une modification de la concentration du Ca^{2+} dans le RS, car la relâche de Ca^{2+} observée lors des protocoles d'imagerie calcique n'était pas statistiquement différente entre les conditions expérimentales (Article 1 Figure supplémentaire 1). Ces résultats indiquent que la surexpression de MURC n'est pas impliquée dans la régulation de l'activité des RyR et de la pompe SERCA qui sont les principales protéines régulant le contenu en Ca^{2+} du RS. De plus, il a été démontré que l'expression de STIM1 est impliquée dans la régulation de la concentration du Ca^{2+} au niveau du RS en condition physiologique dans les cardiomyocytes (Nguyen *et al*, 2013). Or, la surexpression de MURC n'influence pas l'expression protéique de STIM1 et d'Orai1 dans les cardiomyocytes (Article 1 Figures 4A et 4B). Ces observations supportent que l'impact de MURC dans la régulation du SOCE n'est pas associé à une modulation de la concentration Ca^{2+} dans le RS.

Nous avons identifié MURC comme un partenaire d'interaction cellulaire de la protéine STIM1 dans le cœur et les cardiomyocytes (Article 1 Figures 1, 2 et 5) et que son domaine HR1 est important pour assurer cette interaction (Article 1 Figure 2). Dans ce sens, nous avons émis l'hypothèse que l'interaction entre les protéines MURC et STIM1 est importante dans la potentialisation du SOCE observée chez les NRVM surexprimant MURC. Nos résultats ne montrent aucune potentialisation du SOCE avec la surexpression de MURC- Δ HR1 comparativement à la condition contrôle (Article Figures 3D et 3E). Ces résultats indiquent que la régulation du SOCE par la protéine MURC nécessite son interaction avec STIM1 et que son HR1 est important pour assurer cette potentialisation.

Cependant, nous n'avons pas validé que le mutant MURC- Δ HR1 était fonctionnel. Afin de vérifier cet aspect, nous pourrions évaluer l'effet de sa surexpression sur l'activation de la petite protéine G RhoA puisqu'il a été démontré que MURC active cette

protéine (Ogata *et al*, 2008; Rodriguez *et al*, 2011). Une certaine limitation associée à cette expérimentation est à prévoir. Dans l'éventualité que la surexpression du mutant MURC- Δ HR1 n'influence pas l'activité de RhoA, ce constat ne justifierait pas la non-fonctionnalité de cette protéine puisque le domaine HR1 est possiblement impliqué dans l'activation de RhoA. À ce jour, aucune étude n'a identifié les domaines de MURC impliqués dans l'activation de RhoA. Une seconde manière d'évaluer la fonctionnalité du mutant MURC- Δ HR1 serait par l'évaluation son effet sur l'hypertrophie des cardiomyocytes puisque MURC a été associé au développement d'hypertrophie cardiaque pathologique (Bernardo *et al*, 2015; Ogata *et al*, 2014). En évaluant la surface cellulaire des cardiomyocytes par immunofluorescence suivant la surexpression de MURC- Δ HR1, nous pourrions déterminer si MURC- Δ HR1 est fonctionnel. De plus, le domaine HR1 de MURC est impliqué dans l'effet hypertrophique de cette protéine (Naito *et al*, 2015). La surexpression d'un mutant de troncation de la protéine MURC ne possédant plus une partie de son domaine HR1 potentialise son effet hypertrophique dans les cardiomyocytes. On pourrait donc s'attendre à observer une augmentation de l'hypertrophie induite par la surexpression de MURC chez des cardiomyocytes surexprimant le mutant MURC- Δ HR1 si celui-ci est fonctionnel. Cependant, les mêmes limitations associées avec l'activation de RhoA s'appliquent pour l'hypertrophie des cardiomyocytes. Mis à part le domaine HR1, aucune autre information sur les domaines de MURC n'a été associée à ses effets hypertrophiques.

Il serait également intéressant d'évaluer si la surexpression du domaine HR1 seul (MURC-HR1) serait suffisante pour potentialiser le SOCE. Ce type d'expérimentations permettrait de valider l'importance du domaine HR1 de MURC dans la régulation du SOCE et dans son interaction avec STIM1. Dans l'éventualité que MURC-HR1 interagisse avec STIM1 mais que sa surexpression ne potentialise pas le SOCE, cette protéine pourrait être utilisée comme une protéine dominante négative permettant de limiter l'effet de MURC sur le SOCE. De plus, le domaine HR1 est celui ayant la plus haute similarité en acides aminés parmi les membres de la famille des cavins (Kovtun *et al*, 2014). L'évaluation de l'impact du domaine HR1 de MURC sur le SOCE fournirait de l'information additionnelle sur le rôle potentiel des autres cavins dans la régulation du SOCE. Il serait intéressant d'évaluer dans des études futures si les autres membres de la famille des cavins peuvent également participer à la régulation SOCE.

Tel que mentionné précédemment, il existe des SNP menant à des substitutions de résidus dans la séquence en acides aminés de MURC qui l'implique dans le développement de cardiomyopathies. (Rodriguez *et al*, 2011). Parmi ces SNP, deux se retrouvent à l'intérieur du domaine HR1 de MURC : les mutations N128K et R140W (Figure 5). Le rôle fonctionnel de ces mutants dans la régulation du SOCE et de l'homéostasie calcique n'a jamais été étudié. Nous avons émis l'hypothèse que ces mutations influencent la capacité à MURC à réguler le SOCE dans les NRVM. Nos résultats montrent que le mutant R140W est capable d'interagir de manière comparable à la forme sauvage de MURC avec STIM1 et son domaine ERM (Article 1 Figures 5A et 5B). Nos résultats montrent que la surexpression du mutant R140W exacerbe l'effet potentialisateur de MURC sur l'entrée calcique de type SOCE (Article 1 Figures 5D et 5E). De plus, la vitesse de l'entrée calcique observée chez les NRVM surexprimant MURC-R140W était beaucoup plus grande que celles observées dans les autres conditions expérimentales (article figure 5F). Ensemble, ces résultats montrent que la substitution R140W chez MURC exacerbe ses effets sur le SOCE et fournissent les premières évidences d'un mécanisme par lequel cette mutation pourrait contribuer au développement de CMD. De plus, l'exacerbation des effets de MURC par le mutant R140W suggère que cette mutation pourrait favoriser une conformation différente de la protéine STIM1 lorsqu'elle interagit avec MURC. La modification de la conformation de STIM1 pourrait faciliter son activation et celle d'Orai1. À titre de protéine d'échafaudage, le mutant R140W de MURC pourrait influencer la capacité des régulateurs du SOCE à interagir avec les composantes du SOCE. L'arginine en position 140 est possiblement impliquée dans la trimérisation de MURC puisqu'elle fait partie du domaine HR1. Normalement, MURC est connu pour former des homotrimères (Kovtun *et al*, 2014). Cependant, une interaction entre MURC et SDPR/cavin2 a été décrite (Naito *et al*, 2015). L'impact de la mutation R140W sur la trimérisation de MURC n'a pas été examiné dans le cadre de mon projet. Il serait intéressant d'évaluer si ce SNP influence la capacité de MURC à former des hétérotrimères avec SDPR. Une modification de la multimérisation de MURC pourrait influencer la capacité de celle-ci à interagir avec des protéines régulatrices du SOCE. L'évaluation de l'influence de la mutation R140W sur la multimérisation de MURC permettrait de clarifier le mécanisme par lequel cette mutation exacerbe les effets de MURC sur le SOCE.

En somme, la surexpression de MURC dans les NRVM potentialise le SOCE. Cette régulation du SOCE par la surexpression de MURC implique l'interaction de cette protéine avec STIM1. Également, nous avons identifié un premier mécanisme probable par lequel le SNP R140W de MURC contribue au développement de CMD chez l'humain en exacerbant les effets de MURC sur le SOCE.

Modulateurs positifs du SOCE

Malgré l'identification de l'implication de MURC dans la régulation de l'homéostasie calcique des cardiomyocytes, le mécanisme par lequel cette protéine potentialise le SOCE est encore inconnu. Une des hypothèses que nous avons émise est que MURC puisse servir de protéine d'échafaudage permettant de recruter ou de limiter l'interaction entre STIM1 et des modulateurs connus du SOCE. La prochaine section discutera des modulateurs positifs possiblement impliqués dans la régulation du SOCE par MURC.

Le CIF et la $iPLA_2$

Suivant la relâche de Ca^{2+} des réservoirs intracellulaires, plusieurs facteurs et protéines sont activés afin de promouvoir l'activation du SOCE. C'est le cas du Ca^{2+} influx factor (CIF) et de la Ca^{2+} -independant phospholipase A_2 ($iPLA_2$). La $iPLA_2$ est une protéine localisée à la membrane plasmique activatrice des canaux SOC par un mécanisme qui est encore inconnu à ce jour (Bolotina et Csutora, 2005; Smani *et al*, 2004). Or, son activité est régulée de manière négative par la CaM lorsque ces deux protéines interagissent. Le CIF est une molécule biologiquement active dont sa provenance cellulaire est toujours inconnue qui est produit dans le cytoplasme et interagit avec la CaM. Cette interaction prévient la régulation négative de la $iPLA_2$ par la CaM. De cette manière, la $iPLA_2$ active de manière plus prononcée les canaux SOC et une entrée de Ca^{2+} plus efficace est observée. De plus, il a été décrit que l'initiation des mécanismes de production de la CIF requiert la protéine STIM1 (Csutora *et al*, 2008). D'une part, il est possible que MURC régule la production de CIF de manière positive en interagissant avec STIM1 ce qui contribuerait à potentialiser le SOCE. D'autre part, il est probable que la protéine MURC favorise le recrutement de la

PLA₂ aux cavéoles où la protéine STIM1 et les canaux SOC sont présents ce qui favoriserait une activation du SOCE plus efficace.

La CRACR2A

La protéine *CRAC regulator 2A* (CRACR2A) a été récemment identifiée comme un régulateur positif du SOCE chez les lymphocytes T et les cellules endothéliales (Srikanth *et al*, 2010; Wilson *et al*, 2015). Cette protéine possède un domaine *EF-hand* liant le Ca²⁺ et elle interagit avec Orai1 et STIM1. De plus, Srikanth *et al* ont identifié que les domaines CC de STIM1 sont suffisants pour observer une interaction avec CRACR2A. Or, les domaines CC de STIM1 se retrouvent au sein du domaine ERM. Nous avons déterminé que ce domaine est suffisant pour observer une interaction avec MURC (Article 1 Figures 1, 2 et 5). Dans ce sens, il est possible que MURC favorise le recrutement et la stabilisation des interactions entre STIM1, Orai1 et CRACR2A ce qui permettrait une activation du SOCE plus efficace et une entrée de Ca²⁺ plus rapide. De plus, l'expression de CRACR2A n'a été validée que chez les cellules endothéliales dans le cœur (Lopez *et al*, 2016).

La NOX2

Chez les cardiomyocytes, l'implication du SOCE dans la régulation de la génération de ROS a été mise en lumière récemment (Kitajima *et al*, 2016). Or, le canal TRPC3 est un partenaire d'interaction de la *NADPH oxydase 2* (NOX2) permettant de prévenir la dégradation de la NOX2 par le protéasome. De plus, la NOX2 est un régulateur positif de l'activité de TRPC3 lors de cette interaction. Suivant l'entrée de Ca²⁺ effectuée par le canal TRPC3, la génération de ROS est favorisée. Or, il a été démontré que TRPC3 se localise avec Cav3 à la membrane plasmique des cardiomyocytes. Étant donné que MURC est un partenaire d'interaction connu de Cav3 (Naito *et al*, 2015), il est possible qu'un complexe protéique formé de NOX2, Cav3, MURC, STIM1 et TRPC3 s'organise à la membrane plasmique suivant l'activation du SOCE ce qui permettrait une entrée calcique plus efficace en plus de favoriser la formation ROS.

Les septins

Les protéines de la famille des septins assurent plusieurs rôles cellulaires permettant une activation efficace du SOCE dans plusieurs types cellulaires (Sharma *et al*, 2013). Parmi ces rôles, les septins facilitent la localisation de STIM1 à proximité de la membrane plasmique et la formation de microdomaines riches en phosphoinositides à la membrane plasmique. Il a été démontré par la répression de l'expression des septins avec l'utilisation de siRNA que ceux-ci modulent le SOCE de manière positive. Ce qui est intéressant, c'est que les cavéoles sont une sous-classe de radeaux lipidiques riches en phosphoinositides et le domaine HR1 de MURC interagit avec ce type de phospholipides à la membrane plasmique (Kovtun *et al*, 2014). En interagissant avec STIM1, MURC favoriserait le recrutement des septins à la membrane plasmique lors de l'activation du SOCE. Dans ce contexte, un complexe comprenant les protéines MURC, STIM1 et les septins permettant une activation du SOCE plus efficace pourrait se former.

La protéine SGK1

Récemment, le groupe de Sabourin *et al*. a mis en lumière la régulation du SOCE par la signalisation de l'aldostérone et des glucocorticoïdes dans les cardiomyocytes (Sabourin *et al*, 2016). Dans les mécanismes de régulation identifiés par les auteurs, la sérine-thréonine kinase *serum- and glucocorticoid kinase 1* (SGK1) y joue un rôle central. En effet, une stimulation à l'aldostérone potentialise le SOCE dans les NRVM et ces effets ont été corrélés avec une augmentation de l'expression de la SGK1. De plus, la répression de l'expression de la SGK1 et l'utilisation d'un inhibiteur de la SGK1, le GSK650394, abolissent la potentialisation du SOCE induite par l'aldostérone. Suite à ces observations, la SGK1 a été identifiée comme un régulateur positif du SOCE. Puisque MURC régule l'activité des sérine-thréonine kinases ERK1/2 et JNK dans les cardiomyocytes (Ogata *et al*, 2014; Shyu *et al*, 2014), il serait intéressant d'évaluer si MURC interagit et régule l'activité de la SGK1. De plus, l'utilisation du GSK650394 lors d'essais d'imagerie calcique permettrait d'évaluer si SGK1 participe à la potentialisation du SOCE associée à la surexpression de MURC dans les NRVM. Il est possible que MURC favorise la phosphorylation de STIM1 par la SGK1 en interagissant avec STIM1 ce qui modulerait son activité.

Les pompes SPCA

Bien que le rôle principal des *secretory pathway* Ca^{2+} -ATPase (SPCA) soit associé au triage et aux modifications post-traductionnelles de protéines situées dans l'appareil de Golgi, un rôle secondaire des SPCA qui est indépendant de leur activité ATPase a été décrit (Feng *et al*, 2010; Smaardijk *et al*, 2018). En effet, les SPCA peuvent interagir et favoriser l'activation de canal calcique Orai1. Étant donné qu'Orai1 est le principal canal calcique impliqué dans le SOCE, MURC pourrait favoriser le recrutement des SPCA à la membrane plasmique lors de l'activation du SOCE. À titre de protéine d'échafaudage, MURC pourrait induire la formation de complexes cavéolaires favorisant l'activation de Orai1 en recrutant les protéines STIM1 et SPCA. Cependant, le rôle de cette famille de protéines reste à être clarifié dans le cœur et les cardiomyocytes.

La protéine STIMATE

La *STIM-activating enhancer* (STIMATE) est une protéine qui interagit avec STIM1 et qui se retrouve à la jonction cellulaire où les composantes de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique sont à proximité (Jing *et al*, 2015). STIMATE favorise la relocalisation de la protéine STIM1 à proximité de la membrane plasmique en réprimant l'auto-inhibition de la portion C-terminale de cette protéine. En condition basale, une interaction intramoléculaire entre les domaines CC1 et SOAR de STIM1 maintient la portion C-terminale de cette protéine dans un état replié inactif. Or, STIMATE interagit avec le domaine CC1 de STIM1 ce qui inhibe son interaction avec le domaine SOAR et active STIM1. De cette manière, STIMATE favorise la relocalisation de STIM1 à proximité de la membrane plasmique. Les domaines CC1 et SOAR se retrouvent au sein du domaine ERM de STIM1, domaine par lequel STIM1 interagit avec MURC dans les cardiomyocytes (Article 1 Figures 1, 2 et 5). La surexpression de STIMATE augmente la colocalisation de STIM1 et de Orai1 à la membrane plasmique suggérant que STIMATE favorise leur interaction de façon semblable à ce qui a été observé avec la surexpression de MURC (Article 1 Figures 4C et 4D). Il est possible que MURC favorise l'interaction entre STIMATE et STIM1 à titre de protéine d'échafaudage.

Cav1

L'interaction entre la protéine Cav1 et le canal calcique TRPC1 a été décrite à plusieurs reprises dans la littérature (Brazer *et al*, 2003; Kwiatek *et al*, 2006; Lockwich *et al*, 2000). La protéine Cav1 module l'activité du TRPC1 de manière positive en liant la région C-terminale intracellulaire de ce canal. Puisque la protéine MURC est un partenaire d'interaction avec la Cav3 dans les cardiomyocytes (Naito *et al*, 2015), il est probable que cette cavine puisse également interagir avec Cav1. Une plateforme de signalisation calcique pourrait être formée comprenant les protéines Cav1, TRPC1, MURC et STIM1. De cette manière, la protéine MURC favoriserait la localisation de STIM1 aux cavéoles formées par Cav1 et faciliterait l'activation de TRPC1.

Modulateurs négatifs du SOCE

La régulation de l'activité des protéines modulant de manière négative le SOCE est un mécanisme potentiel par lequel la protéine MURC favoriserait une entrée de Ca^{2+} plus efficace. À ce titre, MURC pourrait inhiber ou limiter les effets des modulateurs négatifs sur le SOCE. La prochaine section discute de plusieurs modulateurs négatifs du SOCE et des mécanismes potentiels par lesquels MURC limiterait leurs effets permettant la potentialisation de ce mécanisme cellulaire dans les cardiomyocytes.

La Calmoduline

La CaM est une protéine cytosolique dont l'activité est dépendante du Ca^{2+} . Plusieurs articles ont mis en évidence son implication dans les mécanismes d'inactivation du SOCE (Litjens *et al*, 2007). La CaM interagit avec plusieurs protéines impliquées dans le SOCE dont Orai1, Orai3, STIM1 et STIM2 (Bauer *et al*, 2008; Bergsmann *et al*, 2011; Frischauf *et al*, 2011; Li *et al*, 2017; Liu *et al*, 2012; Parvez *et al*, 2008).

En liant la portion N-terminale des canaux Orai de manière compétitive, la CaM prévient l'interaction de STIM1 et ces canaux. La protéine STIM1 ne peut plus maintenir l'activation des canaux Orai ce qui déclenche l'initiation de leur phase d'inactivation et

diminue l'entrée de Ca^{2+} qui en découle (Mullins *et al*, 2009). La CaM interagit également avec le domaine SOAR de STIM1 ce qui empêche celle-ci de lier et d'activer Orai1. De plus, la CaM est impliquée dans la dé-oligomérisation de STIM1 dans sa forme monomérique inactive. Sous cette conformation, STIM1 n'interagit plus avec Orai1 ce qui mène à l'inactivation du SOCE (Li *et al*, 2017). Toutefois, l'implication d'une régulation négative du SOCE par CaM chez les cardiomyocytes reste à être démontrée.

Nos résultats montrent que MURC interagit avec le domaine ERM de STIM1 et potentialise le SOCE dans les NRVM (Article 1 Figures 1, 2, 3 et 5). Puisque le domaine SOAR est compris dans le domaine ERM de STIM1, il serait intéressant d'évaluer l'impact de MURC sur la capacité de la CaM à interagir avec STIM1. La surexpression de MURC pourrait entrer en compétition avec la CaM pour interagir avec STIM1. Par la loi d'action de masse, l'interaction entre MURC et STIM1 serait favorisée ce qui empêcherait la régulation négative de STIM1 par la CaM. L'interférence potentielle de MURC dans l'interaction entre STIM1 et la CaM pourrait être testée par des coimmunoprécipitations et par de l'imagerie de type FRET dont les bases expérimentales ont été employées pour identifier le rôle négatif de la CaM dans l'interaction entre STIM1 et Orai1 (Li *et al*, 2017).

Afin d'évaluer si la CaM est impliquée dans la potentialisation du SOCE observée lorsque MURC est surexprimé, des expériences d'imagerie calcique utilisant des inhibiteurs de la CaM pourraient être effectuées (Hidaka *et al*, 1981; Torok *et al*, 1998). De cette manière, on pourrait évaluer si la capacité de la CaM à inhiber les différentes composantes du SOCE est altérée par la surexpression de MURC dans les NRVM.

La protéine Golli

Les isoformes de la protéine Golli sont exprimées suivant un épissage alternatif du gène codant pour les *myelin basic proteins* (MBP) et sont présentes dans le cœur (Campagnoni *et al*, 1993). Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de modulateur négatif de l'isoforme Golli-BG21 sur le SOCE dans plusieurs types cellulaires (Feng *et al*, 2006; Paez *et al*, 2007). En interagissant avec la région C-terminale de STIM1, Golli-BG21 induit une diminution du SOCE observé par imagerie calcique (Walsh *et al*, 2010). La

localisation de Golli-BG21 à la membrane plasmique semble être un facteur important pour assurer sa régulation négative du SOCE. La mutation dirigée des sites de myristoylation de Golli-BG21 par des glycines prévient sa localisation à la membrane plasmique et abolit ses effets sur le SOCE (*Paez et al*, 2007).

La protéine MURC pourrait interférer dans l'interaction entre les protéines Golli et STIM1 ce qui préviendrait l'inhibition du SOCE. Également, l'interaction entre STIM1 avec MURC pourrait modifier le routage cellulaire de STIM1 à proximité de la membrane plasmique et influencerait la capacité de Golli à inhiber le SOCE. La protéine MURC est possiblement impliquée dans la régulation de la myristoylation de protéines chez les cardiomyocytes. Par exemple, la surexpression de MURC pourrait inhiber l'activité des N-myristoyltransférases agissant sur la protéine Golli et prévenir le routage de cette protéine à la membrane plasmique où elle inhiberait le SOCE (*Martin et al*, 2011).

La protéine POST

La protéine *partner of STIM1* (POST), aussi nommée TMEM20, a été caractérisée comme étant un partenaire d'interaction avec les protéines STIM1 et Orai1 (*Krapivinsky et al*, 2011; *Ritchie et al*, 2012). Bien que POST ne semble pas avoir un rôle direct dans l'activation du SOCE, son interaction avec STIM1 lui permet réguler de manière négative la pompe PMCA située à la membrane plasmique. L'inhibition de la PMCA par POST diminue l'extrusion de Ca^{2+} cellulaire et augmente la probabilité de la formation de microdomaines à concentration élevée de Ca^{2+} . L'inhibition dépendante du Ca^{2+} (CDI) des protéines STIM1 et Orai1 à proximité POST est alors plus probable. Il est possible que MURC influence le routage de STIM1 à proximité de la membrane plasmique de manière à prévenir son interaction avec POST et le CDI créé par l'inhibition de la PMCA. Nos résultats d'imagerie calcique montrent un retour à la concentration calcique basale qui est légèrement plus rapide suivant l'induction d'une relâche de Ca^{2+} par la TG et la caféine chez les cardiomyocytes où MURC était surexprimée comparativement aux NRVM surexprimant βGal (Article 1 Supplemental Figure 1C). Cette faible variation peut être due à l'augmentation de l'activité de la PMCA chez les NRVM surexprimant MURC.

La protéine ORMDL3

La protéine *orosomucoid-like 3* (ORMDL3) est localisée au réticulum endoplasmique et elle a été principalement étudiée pour son rôle dans les processus inflammatoires associés à l'asthme (*Hjelmqvist et al*, 2002). Cette protéine est exprimée de manière ubiquitaire et régule l'activité de la pompe SERCA en interagissant avec celle-ci (*Cantero-Recasens et al*, 2010; *Carrera-Suredas et al*, 2013). Également, ORMDL3 agit comme un régulateur négatif du SOCE en diminuant la recapture de Ca^{2+} mitochondriale par un mécanisme reste à élucider et qui prolonge la CDI (*Carrera-Suredas et al*, 2013). Suivant l'activation du SOCE, ORMDL3 se relocalise près de la protéine STIM1 à proximité de la membrane plasmique, mais n'interagit pas avec celle-ci. À ce stade, ORMDL3 stabilise la concentration du Ca^{2+} environnant les complexes protéiques formés de STIM1 et des canaux calciques permettant une CDI soutenue. De plus, la régulation négative du SOCE par ORMDL3 est indépendante de son effet sur l'activité de SERCA (*Carrera-Suredas et al*, 2013).

En interagissant avec STIM1, MURC pourrait modifier le routage de cette protéine à proximité de la membrane plasmique et l'éloigner d'ORMDL3 suivant l'activation du SOCE ce qui limiterait l'effet de la CDI. Il serait également intéressant d'évaluer l'effet de la surexpression de MURC sur la recapture de Ca^{2+} mitochondrial puisque ce mécanisme influence directement la CDI des canaux calciques impliqués dans le SOCE. En augmentant la recapture dans ce compartiment cellulaire, MURC limiterait l'effet de la CDI sur le SOCE. L'utilisation d'outils pharmacologiques influençant la recapture calcique mitochondriale tels l'antimycin A, l'oligomycin, le kaempferol et des sondes calciques mitochondriales comme la *mtPericamR* ou la *rhod-5V* permettrait de tester cette hypothèse (*Duchen*, 1999; *Fuente et al*, 2012; *Montero et al*, 2004; *Nagai et al*, 2001).

SARAF

La *SOCE-associated regulatory factor* (SARAF) est une protéine impliquée dans la régulation du SOCE à plusieurs niveaux (*Palty et al*, 2012). Elle est principalement localisée au réticulum endoplasmique, mais elle possède également une expression constitutive à la membrane plasmique (*Albarran et al*, 2017). Elle participe à la régulation

du SOCE de manière séquentielle en interagissant avec plusieurs composantes du SOCE (Albarran *et al*, 2016; Albarrán *et al*, 2016; Palty *et al.*, 2012).

En absence d'activation du SOCE, SARAF interagit avec les domaines SOAR et ID de STIM1 de manière à maintenir STIM1 dans un état monomérique inactif ce qui prévient une activation spontanée du SOCE (Jha *et al*, 2013). Suivant l'activation du SOCE, SARAF se dissocie de STIM1 et se relocalise à proximité de la membrane plasmique où il interagit avec Orai1. L'impact de l'interaction entre SARAF et Orai1 à cette étape de l'activation du SOCE reste encore à être évaluée. Lorsque STIM1 se relocalise à proximité de la membrane plasmique et provoque l'ouverture du canal Orai1, SARAF se dissocie d'Orai1 pour interagir à nouveau avec STIM1. À ce moment, SARAF favorise l'initiation de la CDI tout en induisant la dé-oligomérisation de STIM1 ce qui inhibe le SOCE (Jardín *et al*, 2018). De plus, SARAF semble requérir la présence de plusieurs composantes de la membrane plasmique pour médier ses effets sur le SOCE. En effet, elle se localise à des microdomaines de la membrane plasmique riches en PIP2 et où les protéines Cav1, synaptotagmin 1 (ESyt-1) et septin4 sont présentes. Par la répression de l'expression de ces protéines par siRNA, il a été démontré que l'effet inhibiteur de SARAF sur le SOCE est considérablement réduit (Maléth *et al*, 2014). Il est intéressant de noter que ces microdomaines membranaires ont des caractéristiques semblables à celles des cavéoles. SARAF inhibe également le canal calcique TRPC1 de manière constitutive à la membrane plasmique en interagissant avec celui-ci et ne nécessite pas la présence de STIM1 ou d'Orai1 pour médier cet effet. SARAF interagit également avec TRPC6 de manière constitutive, mais ne semble pas influencer son activité (Albarran *et al*, 2016).

En absence d'activation du SOCE, il est possible que MURC interfère dans l'interaction entre SARAF et STIM1 et prévienne le maintien d'une conformation inactive de STIM1. De plus, nos résultats indiquent que la surexpression de MURC dans les cardiomyocytes favorise l'interaction entre STIM1 et Orai1 ce qui contribuerait à une activation du SOCE plus efficace dans ces conditions (Article 1 Figures 4C et 4D). Il est plausible de penser que MURC diminue l'impact de SARAF sur le SOCE en favorisant le routage de la protéine STIM1 à proximité de la membrane plasmique où elle interagit avec le canal Orai1. Nos résultats démontrent également que MURC interagit avec le domaine

ERM de STIM1 chez les cardiomyocytes (Article 1 Figures 1, 2 et 5). Or, le domaine ERM de STIM1 contient les domaines SOAR et ID qui sont importants dans son interaction avec SARAF. Il serait intéressant d'identifier les résidus qui assurent l'interaction entre STIM1 et MURC afin d'évaluer si ceux-ci sont également impliqués dans l'interaction de cette protéine avec SARAF.

MURC pourrait modifier la localisation de STIM1 à proximité de la membrane plasmique suivant l'activation du SOCE empêchant SARAF de participer à la CDI d'Orai1. Cependant, MURC et les autres cavins possèdent une forte affinité pour le PIP2 et les PS de la membrane plasmique (Kovtun *et al*, 2014). Étant donné que SARAF se localise à des microdomaines riches en PIP2, il est possible que MURC et SARAF se retrouvent dans les mêmes microdomaines régulant le SOCE. Chez les cardiomyocytes, Cav3 est la cavéoline la plus exprimée et MURC est un partenaire d'interaction connu de cette protéine (Naito *et al*, 2015). Contrairement aux cavéoles formées par la Cav1 qui comprennent les protéines ESyt-1 et septin4, celles formées par la Cav3 peuvent contenir des protéines différentes qui ne permettent pas à SARAF de s'y localiser. MURC pourrait favoriser la localisation de STIM1 aux cavéoles formées par la Cav3 suivant l'activation du SOCE ce qui préviendrait l'inhibition de ce mécanisme d'entrée du Ca^{2+} par SARAF.

L' α -tubuline et les microtubules

L' α -tubuline est l'une des composantes du cytosquelette secondaire formé de microtubules. Le cytosquelette sert de plateforme permettant le transit cellulaire de plusieurs protéines. Parmi celles-ci, il a été démontré que STIM1 se colocalise avec l' α -tubuline et la protéine EB1 (Baba *et al*, 2006; Grigoriev *et al*, 2008; Smyth *et al*, 2007, 2009). Il a également été démontré que la déstabilisation des microtubules par des agents tels la colchicine et le nocodazole provoquait une potentialisation du SOCE. Dans ce sens, l' α -tubuline pourrait jouer au rôle de régulateur négatif du SOCE en éloignant STIM1 de ses canaux calciques ciblent. En modifiant le routage de STIM1 à proximité des cavéoles à la membrane plasmique, MURC pourrait diminuer l'effet restrictif des microtubules et de l' α -tubuline sur la localisation de STIM1. De plus, la protéine MURC est un régulateur connu de la petite protéine G RhoA qui est impliquée dans le remodelage du cytosquelette

d'actine ce qui pourrait également moduler indirectement l'interaction entre STIM1 et l' α -tubuline (Ogata *et al*, 2008).

La FLNA

La filamin A (FLNA) est une protéine qui fait partie du cytosquelette d'actine et qui participe à plusieurs voies de signalisation cellulaire (Ithychanda *et al*, 2009). Cette protéine interagit également avec STIM1 et régule de manière négative le SOCE (Lopez *et al*, 2018). Cette interaction requiert la phosphorylation de la FLNA sur sa sérine en position 2152 qui est effectuée par la PKA. En inhibant cette phosphorylation par l'utilisation de l'agent KT-5720, le groupe de Lopez *et al* a démontré que la FLNA ne pouvait plus interagir avec STIM1 ce qui potentialise le SOCE. L'effet inverse a été observé par l'utilisation de brefeldin A (BFA), un activateur de la phosphorylation de la FLNA. Dans notre contexte, MURC pourrait agir à deux niveaux sur l'inhibition du SOCE par la FLNA. D'une part, MURC pourrait altérer la localisation de STIM1 et prévenir son interaction avec la FLNA. D'autre part, MURC pourrait interférer dans le mécanisme de phosphorylation de la FLNA par la PKA et limiter la capacité de celle-ci à interagir avec STIM1. Des essais d'imagerie calcique chez des cardiomyocytes surexprimant MURC et traités avec le KT-5720 ou la BFA pourraient être effectués afin d'évaluer si la FLNA est impliquée dans la potentialisation du SOCE induite par la surexpression de MURC. De plus, MURC régule le remodelage du cytosquelette en participant à la régulation de la petite protéine G RhoA ce qui pourrait également modifier la capacité de la FLNA à interagir avec STIM1 (Ogata *et al*, 2008).

La PKC

La famille des PKC participe à la régulation du SOCE en effectuant la phosphorylation de plusieurs canaux calciques. Bien que la phosphorylation du canal TRPC6 par la PKC peut l'activer (Kim et Saffen, 2005), la phosphorylation de TRPC6 et de plusieurs autres canaux tels Orai1, TRPC4 et TRPC5 par cette kinase provoque leur inhibition (Bousquet *et al*, 2010; Kawasaki *et al*, 2010; Venkatachalam *et al*, 2003). En interagissant avec STIM1, MURC pourrait favoriser la formation de complexes protéiques

à proximité de la membrane plasmique limitants la phosphorylation des canaux impliqués dans le SOCE. Dans le but d'évaluer le rôle de MURC dans la régulation de la phosphorylation des canaux calciques par la PKC, des essais d'imagerie calcique en présence d'activateurs de la PKC tels le DAG et le 4 α -phorbol-12-myristate-13-acetate (TPA) ou d'inhibiteurs tels le GF109203X (GFX), la calphostin C et le Go6983 nous pourraient être accomplis (Kawasaki *et al*, 2010). Des expérimentations complémentaires évaluant par immunobuvardage la variation de la phosphorylation des canaux Orai1, TRPC4, TRPC5 et TRPC6 en présence ou en absence de MURC pourraient être effectuées. Ces expériences permettraient de clarifier si une altération de la phosphorylation des canaux calciques par la PKC survient lorsque MURC est surexprimé dans les NRVM.

La PKG

La famille de protéine kinase G (PKG) participe à la régulation du SOCE de plusieurs manières. L'une d'entre elles est par la phosphorylation du canal Orai1 qui régule négativement son activité (Wang *et al*, 2015). Tout comme pour la PKC, MURC pourrait interférer dans la phosphorylation d'Orai1 par la PKG en favorisant l'interaction de ce canal avec la protéine STIM1 (Article 1 Figures 4C et 4D). La prévention de la phosphorylation d'Orai1 par la PKG permettrait une entrée de Ca²⁺ plus soutenue suivant l'activation du SOCE.

L'oxydation de la PKG affecte sa capacité à phosphoryler ses protéines cibles tel le canal TRPC6 (Nakamura *et al*, 2015). Or, le SOCE a été impliqué dans la génération de ROS qui contribuent à augmenter le stress oxydatif dans l'environnement intracellulaire (Kitajima *et al*, 2016). En potentialisant le SOCE, la surexpression de MURC contribue possiblement à augmenter l'oxydation de protéine dans le cytoplasme comme la PKG. Ce phénomène produit possiblement une boucle de rétrocontrôle positive qui limiterait la phosphorylation de TRPC6 et favoriserait son activation ce qui contribuerait à potentialiser le SOCE.

La protéine STC2

L'expression de plusieurs protéines en réponse à divers stress cellulaires peut survenir suivant l'activation du SOCE, notamment en lien avec son rôle dans l'augmentation du stress oxydatif (Kitajima *et al*, 2016). Parmi ces protéines, la protéine

stanniocalcin 2 (STC2), qui est exprimée dans le cœur, contribue à l'inhibition du SOCE face à ces différents stress cellulaires en interagissant avec STIM1 par un mécanisme qui est encore inconnu (Zeiger *et al*, 2011). Suivant l'activation du SOCE, STC2 se relocalise près STIM1 à proximité de la membrane plasmique. Il est possible que MURC interfère dans l'interaction entre les protéines STIM1 et STC2 puisque MURC est un partenaire d'interaction de STIM1 dans les cardiomyocytes. Du même fait, l'inhibition du SOCE par la STC2 serait moins importante. Nous pourrions évaluer si la surexpression de MURC dans les NRVM affecte celle de la STC2.

La protéine STIM2

La protéine STIM2, tout comme STIM1, est exprimée dans le cœur (Darbellay *et al*, 2010). Elle peut influencer la relocalisation de STIM1 à proximité de la membrane plasmique en formant des hétérodimères avec celle-ci ce qui contribuerait à inhiber l'activation du SOCE par STIM1 (Soboloff *et al*, 2006). Nos résultats démontrent que MURC interagit avec STIM1 et que sa surexpression dans les NRVM augmente l'interaction entre STIM1 et Orai1 en condition basale (Article 1 Figures 4C et 4D). Or, l'interaction entre STIM1 et Orai1 se produit à proximité de la membrane plasmique ce qui signifie que STIM1 est apte à s'y localiser. Il est possible que MURC facilite la formation d'homodimères de STIM1 en interférant dans l'interaction entre les protéines STIM1 et STIM2. Des coimmunoprécipitations seraient intéressantes à effectuer pour évaluer la modulation de la dimérisation des protéines STIM1 et STIM2 par la protéine MURC. La prévention de la formation d'hétérodimères de STIM1-STIM2 par la surexpression de MURC pourrait expliquer en partie comment cette protéine potentialise le SOCE dans les cardiomyocytes.

Signalisation de l'acide arachidonique

Un second mécanisme de régulation de l'homéostasie calcique qui possède plusieurs composantes du SOCE est l'entrée de Ca^{2+} médiée par l'acide arachidonique (AA) (Mignen et Shuttleworth, 2000). Plusieurs caractéristiques différencient l'entrée calcique de type AA de celle de type SOCE. L'entrée calcique de type AA est indépendante des réserves intracellulaires de Ca^{2+} contrairement au SOCE (Mignen *et al*, 2007). De plus, bien que ces deux mécanismes soient régulés par la protéine STIM1, seule la population de

la protéine STIM1 qui est exprimée de manière constitutive à la membrane plasmique est impliquée dans la régulation de la signalisation de l'AA (Mignen *et al*, 2009). De plus, les protéines STIM1 qui sont exprimées constitutivement à la membrane plasmique possèdent une portion N-terminale orientée vers le milieu extracellulaire. Cette population de STIM1 peut être inhibée par l'utilisation d'un anticorps ciblant sa portion N-terminale (Mignen *et al*, 2007). L'activation de la signalisation calcique de l'AA peut s'effectuer avec des concentrations physiologiques de différents activateurs tels l'acide arachidonique, la cholecystokinine, la trypsine et le leukotriène C₄ (González-Cobos *et al*, 2013; Shuttleworth *et al*, 2004). Les canaux calciques impliqués dans la signalisation de l'AA (ARC) sont des hétéropentamères composés de trois monomères d'Orai1 et de deux monomères d'Orai3 (Mignen *et al*, 2007, 2008, 2009). De plus, les canaux ARC peuvent être inhibés par la calcineurine ce qui n'est pas le cas des canaux impliqués dans le SOCE (Shuttleworth *et al*, 2004). Les deux voies signalétiques peuvent être activées par la TG (Bolotina, 2008). Ensemble, ces caractéristiques de la signalisation calcique de l'AA se distinguent de celles du SOCE tout en ayant des composantes similaires.

Il est probable que MURC soit impliqué dans la régulation de la signalisation de l'AA. Nous avons démontré que MURC interagit avec STIM1 (Article 1 Figures 1, 2 et 5) et il est possible que MURC modifie le routage de STIM1 à proximité de la membrane plasmique. Il serait intéressant de faire des essais de biotinylation de surface afin d'évaluer si MURC modifie la proportion de protéines STIM1 constitutivement localisée à la membrane plasmique. Des expériences d'immunofluorescence pourraient également nous renseigner sur la modulation potentielle de la localisation cellulaire de STIM1 par la protéine MURC.

Il est possible que la surexpression de MURC potentialise également la voie de signalisation calcique de l'AA puisque cette surexpression potentialise le SOCE (Article 1 Figures 3 et 5). Nous pourrions effectuer les mêmes protocoles d'imagerie calcique employés pour évaluer le SOCE, mais en stimulant les cellules à l'AA au lieu de la TG et de la caféine pour tester cette hypothèse. Nous pourrions aussi évaluer l'impact du domaine HR1 et de la substitution R140W de MURC dans ce contexte. De plus, il est possible que la signalisation de l'AA contribue à l'augmentation de l'entrée calcique de type SOCE observée avec la surexpression de MURC. Nous pourrions évaluer cette contribution en

effectuant de l'imagerie calcique avec des NRVM surexprimant MURC ayant été préincubés avec un anticorps ciblant la portion N-terminale de STIM1 pour inhiber la signalisation de l'AA. Également, nous pourrions accomplir ces expériences avec l'utilisation d'inhibiteurs de la calcineurine tels la cyclosporine A ou l'ascomycin pour activer cette voie signalétique de l'AA (Shuttleworth *et al*, 2004). De plus, il existe des mutants dominants négatifs d'Orai1 et d'Orai3 pour la signalisation calcique de l'AA qui n'influencent pas leurs rôles dans le SOCE (Mignen *et al*, 2008). Nous pourrions effectuer des essais fonctionnels en surexprimant ces mutants dans les NRVM afin de discriminer la contribution de la signalisation calcique de l'AA dans la potentialisation du SOCE par MURC.

Puisque MURC augmente l'interaction entre STIM1 et Orai1 lorsque les réservoirs intracellulaires de Ca^{2+} sont remplis (Article 1 Figures 4C et 4D), il serait intéressant d'évaluer si MURC augmente également l'interaction entre STIM1 et Orai3 dans les cardiomyocytes. Ces expérimentations valideraient davantage que la surexpression de MURC favorise les interactions entre STIM1 et les canaux Orai1 et Orai3 ce qui contribuerait à potentialiser le SOCE, mais également son rôle potentiel dans la régulation de la signalisation de l'AA.

Pour être exprimée à la membrane plasmique de manière constitutive, la protéine STIM1 doit sous une forme glycosylée (Olivier *et al*, 2007). Il serait intéressant d'évaluer si la surexpression de MURC modifie le niveau de glycosylation de la protéine STIM1. De cette manière, nous pourrions déterminer si MURC favorise l'expression constitutive de STIM1 à la membrane plasmique et du même fait la signalisation calcique de l'AA.

En somme, les composantes calciques impliquées dans le SOCE telles STIM1, Orai1 et Orai3 participent également à la signalisation calcique de l'AA. Puisque nous avons démontré que MURC potentialise le SOCE dans les cardiomyocytes, il est pertinent d'évaluer son effet sur la régulation de la signalisation calcique de l'AA ce qui permettrait de préciser ses rôles cellulaires dans l'homéostasie calcique. De cette manière, nous pourrions mieux comprendre la contribution de la protéine MURC dans le développement de différentes pathologies cardiaques.

Impact de MURC sur l'activité de l'ADCY6

La communication signalétique entre le SOCE et les voies de signalisation cellulaires reliées à adénylate cyclase a fait l'objet de plusieurs études (Cooper, 2015). Dans le cœur, l'adénylate cyclase de type 6 (ADCY6) joue un rôle physiologique important et assure le bon fonctionnement de cet organe. De plus, plusieurs études précliniques ont mis en évidence les effets thérapeutiques bénéfiques potentiels de l'ADCY6 dans le traitement de l'insuffisance cardiaque et de plusieurs autres cardiomyopathies (Gao *et al*, 1998, 1999; Hammond *et al*, 2016; Lai *et al*, 2000, 2004; Roth *et al*, 1999, 2002). De plus, l'ADCY6 est un partenaire d'interaction de STIM1 et son activité est régulée par le Ca^{2+} (Motiani *et al*, 2018; Soboloff *et al*, 2018). De plus, l'ADCY6 est localisée à proximité de la membrane plasmique dans des régions riches en lipides tels les radeaux lipidiques et les cavéoles (Cooper et Crossthwaite, 2006; Halls et Cooper, 2017; Head *et al*, 2006; Motiani *et al*, 2018; Patel *et al*, 2008).

Étant donné que nos résultats montrent que MURC interagit avec STIM1 dans les cardiomyocytes (Article 1 Figures 1, 2 et 5), il est possible que MURC puisse faciliter l'interaction entre STIM1 et ADCY6 à titre de protéine d'échafaudage. De plus, l'implication de MURC dans les voies signalétiques de l'AMPc chez les cardiomyocytes a également été démontrée (Ogata *et al*, 2014). Cependant, l'ion Ca^{2+} régule l'ADCY6 de manière négative (Cooper, 2015; Halls et Cooper, 2017) et nous avons démontré que MURC potentialise le SOCE dans les NRVM (Article 1 Figures 3 et 5) ce qui favoriserait la régulation négative de l'ADCY6. Il serait intéressant de clarifier l'implication de la protéine MURC dans la régulation de l'activité de l'ADCY6. L'intérêt thérapeutique pour l'ADCY6 dans le cœur pourrait faire de MURC et STIM1 des cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement de maladies cardiaques.

Clarification du rôle de MURC dans l'homéostasie calcique des cardiomyocytes

Notre étude a mis en lumière l'implication de la protéine MURC dans la régulation du SOCE chez les cardiomyocytes. Toutefois, les mécanismes par lesquels MURC et possiblement les autres composantes des cavéoles participent à cette régulation de l'homéostasie calcique cellulaire sont encore inconnus. Afin de fournir des pistes d'études

pour mieux comprendre le rôle de MURC dans l'homéostasie calcique des cardiomyocytes, la prochaine section discute d'expérimentations potentielles qui pourraient être accomplies.

Interactome de MURC et de STIM1 dans les cardiomyocytes

L'identification de l'interactome des protéines STIM1 et MURC dans les cardiomyocytes permettrait de cibler des partenaires cellulaires communs à ces deux protéines. De plus, nous pourrions évaluer le dynamisme de ces partenaires lorsque le SOCE est activé comparativement à des conditions où les réservoirs intracellulaires de Ca^{2+} sont remplis. Plusieurs techniques associées au domaine de la protéomique pourraient être employées pour identifier l'interactome de MURC et de STIM1. Parmi ces techniques, les essais de proximité du type APEX ont un potentiel intéressant en raison de leur rapidité et de leur spécificité de marquage (Hung *et al*, 2016; Yang *et al*, 2015).

Impact des domaines et des mutations de MURC l'impliquant dans les CMD

Nous avons démontré que le domaine HR1 ainsi que le mutant R140W de MURC révélé dans le développement de CMD ont un impact sur la potentialisation du SOCE induite par la surexpression de MURC (Article 1 Figures 2, 3 et 5). Il serait ainsi intéressant d'évaluer l'impact des domaines connus de MURC (domaines CC et PEST) ainsi que les autres SNP de MURC révélées dans le développement de CMD (N128K, L153P, S307T, P324L et S364L) sur la régulation du SOCE dans les cardiomyocytes (Rodriguez *et al*, 2011). De plus, le domaine CC et la mutation N128K se retrouvent à l'intérieur du domaine HR1 de MURC. L'évaluation de l'impact de ces composantes structurales sur l'interaction entre MURC et STIM1 fournirait des informations supplémentaires sur les mécanismes par lesquels MURC potentialise le SOCE.

Génération de chimères de MURC comprenant les domaines HR1 des autres cavins

Puisqu'une grande similarité existe entre les domaines HR1 des membres de la famille des cavins, il serait intéressant de générer des protéines chimériques de MURC possédant les domaines HR1 des autres cavins et d'évaluer leur capacité à interagir avec STIM1. La capacité des autres cavins à interagir avec STIM1 pourrait être évaluée afin de déterminer si l'interaction entre MURC et STIM1 est unique à cette protéine ou si elle est conservée parmi les membres de cette famille de protéines. De cette manière,

l'identification de résidus communs ou distincts entre les domaines HR1 des cavins importants pour l'interaction avec STIM1 pourrait être accomplie.

Potentialisation du SOCE par MURC via le canal calcique Orai1

Il serait intéressant d'évaluer si la potentialisation du SOCE observée avec une surexpression de MURC est médiée par une activation plus soutenue et efficace du canal Orai1. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions effectuer de l'imagerie calcique chez des NRVM surexprimant MURC une forme d'Orai1 ayant une mutation dominante négative. Les substitutions R91W, G98A, E106Q ou E190Q d'Orai1 peuvent toutes servir de mutants dominants négatifs (Feske *et al*, 2006; Gwack *et al*, 2007; Wang *et al*, 2015). De cette manière, la potentialisation du SOCE médiée par la surexpression de MURC devrait être prévenue si elle implique une régulation positive d'Orai1 puisque ces mutants dominants négatifs de Orai1 sont incapables de produire une entrée calcique efficace.

Évaluation de la nécessité de MURC dans la régulation du SOCE chez les NRVM

Nos résultats démontrent que la surexpression de MURC est suffisante pour réguler le SOCE dans les cardiomyocytes. Cependant, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence la nécessité de MURC dans ce mécanisme d'homéostasie calcique cellulaire. Cependant, j'ai généré deux adénovirus permettant de surexprimer un ARN interférant (shRNA) ciblant la forme endogène de MURC (shMURC) dans les NRVM. Ces shRNA de MURC ont été validés par qPCR sans pour autant réussir à démontrer une diminution de l'expression de la protéine par immunobuvardage (résultats non divulgués). Étant donné que le SOCE dans les NRVM est faible dans nos conditions expérimentales (environ 15 nM de Ca^{2+}), il est possible que l'impact des shRNA de MURC sur le SOCE soit difficilement mesurable dans ce contexte. Afin de pallier à ce manque de sensibilité potentielle, nous pourrions surexprimer les protéines STIM1 et Orai1 afin de potentialiser le SOCE en présence d'un shRNA contrôle ou des shMURC. De cette manière, si MURC est nécessaire dans le SOCE, la potentialisation de l'entrée calcique chez les NRVM surexprimant STIM1 et Orai1 serait moins importante en présence des shMURC comparativement au shRNA contrôle.

Localisation des composantes du SOCE lorsque MURC est surexprimé

Une information qui nous permettrait de mieux comprendre le rôle cellulaire de MURC dans la régulation du SOCE est de clarifier le dynamisme moléculaire des composantes du SOCE lorsque MURC est surexprimé dans les cardiomyocytes. Pour ce faire, il serait intéressant d'effectuer des expériences d'immunofluorescence couplées à la microscopie confocale afin d'évaluer la localisation cellulaire de STIM1, des canaux Orai, des canaux TRPC et de MURC. De cette manière, nous pourrions évaluer si MURC augmente la colocalisation de STIM1 et de Orai1 ce qui supporterait nos résultats de coimmunoprécipitation (Article 1 Figures 4C et 4D). De plus, nous pourrions évaluer la modification de la localisation des composantes du SOCE lorsque MURC est surexprimée dans les NRVM. Il serait également intéressant d'effectuer ces expériences en surexprimant le mutant de troncation MURC-ΔHR1 et le mutant MURC-R140W afin d'observer comment ces protéines influencent la localisation des composantes du SOCE comparativement à la forme sauvage de MURC.

Conclusion

Notre étude a mis en lumière l'implication de la protéine MURC comme une nouvelle composante cellulaire participant à la régulation du SOCE dans les cardiomyocytes (Figure 7). Par la recherche de partenaires cellulaires de la protéine STIM1 dans le cœur, nous avons validé l'interaction entre MURC et cette protéine dans les cardiomyocytes. De plus, nous avons identifié les domaines HR1 de MURC et ERM de STIM1 comme étant suffisants pour assurer l'interaction entre ces deux protéines. Ensuite, nous avons démontré que la surexpression de la protéine MURC dans les cardiomyocytes potentialise l'entrée de Ca^{2+} de type SOCE. De plus, la présence du domaine HR1 de MURC est requise pour que cette protéine puisse potentialiser le SOCE dans les cardiomyocytes. Notre étude a démontré que la surexpression de MURC n'influence pas l'expression endogène des protéines STIM1 et Orai1, mais qu'il augmente leur interaction dans des conditions où les réservoirs intracellulaires de Ca^{2+} sont remplis. Également, nous avons démontré que la substitution R140W présente dans le domaine HR1 de MURC exacerbe les effets de cette protéine sur le SOCE sans interférer dans son interaction avec la protéine STIM1. En perspective, l'implication de la protéine MURC dans la régulation du SOCE clarifie le rôle cellulaire de cette protéine dans le cœur et les cardiomyocytes. Étant

donné que la protéine MURC et le SOCE sont impliqués dans diverses pathologies cardiaques, il serait grandement intéressant d'évaluer l'importance de MURC dans le développement de maladies du cœur médiées par le SOCE, mais également la contribution du SOCE dans les effets délétères de la protéine MURC sur les cardiomyocytes. Dans cette optique, nous avons identifié MURC comme étant une cible thérapeutique potentielle qui est différente de celles ciblées actuellement au point de vue clinique. De plus, cette étude clarifie le lien fonctionnel qui existe entre les cavéoles et l'homéostasie calcique. Il serait intéressant d'évaluer l'impact de MURC sur la modulation des autres mécanismes de régulation de la concentration du Ca^{2+} dans le cœur et les cardiomyocytes tels le CICR et le ROCE.

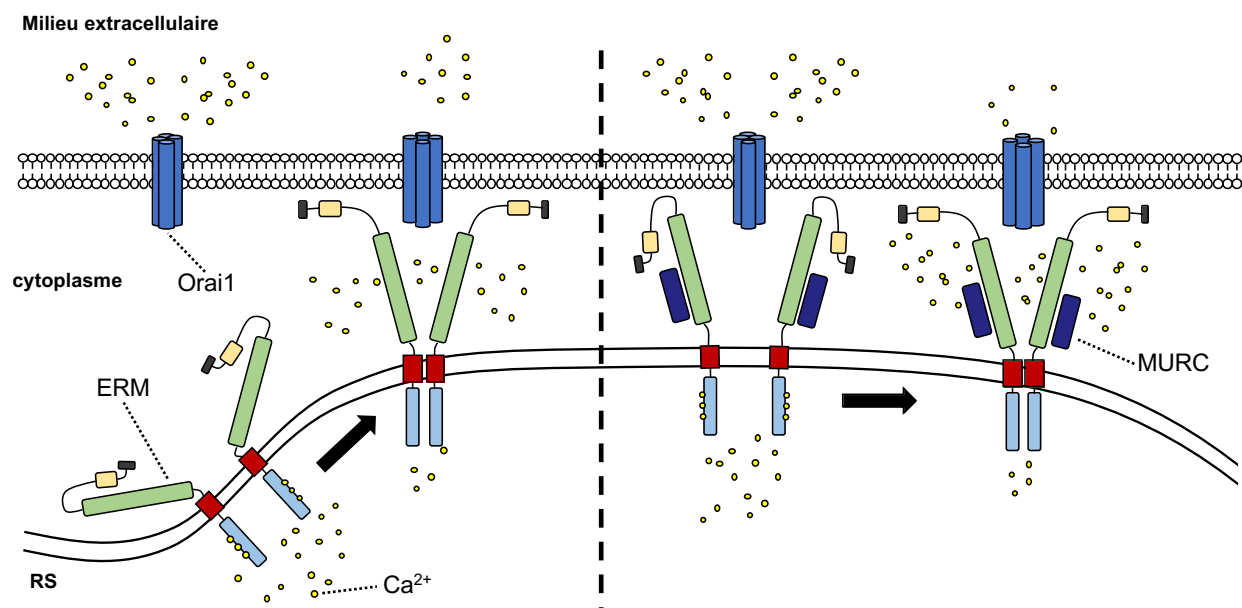


Figure 7 : La protéine MURC interagit avec STIM1 et potentialise le SOCE dans les cardiomyocytes.

Schéma décrivant l'impact de la protéine MURC dans la régulation du SOCE chez des cardiomyocytes via son interaction avec la protéine STIM1. Lorsque STIM1 est inactif, il se retrouve sous une forme monomérique repliée. Suivant une relâche de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (RS) vers le cytoplasme (flèche noire), la diminution de la concentration de Ca^{2+} dans ce compartiment cellulaire provoque l'activation de STIM1 qui s'organise sous une forme dimérique relâchée. La protéine STIM1 se rapproche à proximité de la membrane plasmique où elle interagit et active les canaux calciques du SOCE tel Orai1. Une entrée de Ca^{2+} extracellulaire survient après l'activation de ces canaux (gauche). Lorsque la protéine MURC est surexprimée dans les cardiomyocytes (droite), celle-ci interagit avec le domaine ERM de STIM1 via son domaine HR1. Par sa surexpression, MURC augmente le niveau d'interaction entre STIM1 et Orai1. Lors de l'activation du SOCE, STIM1 est déjà à proximité de Orai1 à la membrane plasmique. L'entrée calcique qui s'en suit est plus rapide et plus importante comparativement à une situation où seulement la forme endogène de MURC est exprimée. De cette manière, la surexpression de MURC potentialise le SOCE chez les cardiomyocytes.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Albarran, L., Lopez, J. J., Amor, N. B., Martin-Cano, F. E., Berna-Erro, A., Smani, T., ... Rosado, J. A. (2016). Dynamic interaction of SARAF with STIM1 and Orai1 to modulate store-operated calcium entry. *Scientific Reports*, 6, 24452.
- Albarrán, L., López, J. J., Gómez, L. J., Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2016). SARAF modulates TRPC1, but not TRPC6, channel function in a STIM1-independent manner. *The Biochemical Journal*, 473(20), 3581–3595.
- Albarran, L., Lopez, J. J., Woodard, G. E., Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2016). Store-operated Ca²⁺ Entry-associated Regulatory factor (SARAF) Plays an Important Role in the Regulation of Arachidonate-regulated Ca²⁺ (ARC) Channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(13), 6982–6988.
- Albarran, L., Regodón, S., Salido, G. M., Lopez, J. J., & Rosado, J. A. (2017). Role of STIM1 in the surface expression of SARAF. *Channels (Austin, Tex.)*, 11(1), 84–88.
- Ambudkar, I. S., de Souza, L. B., & Ong, H. L. (2017). TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: Friends in tight spaces. *Cell Calcium*, 63, 33–39.
- Aronsen, J. M., Louch, W. E., & Sjaastad, I. (2016). Cardiomyocyte Ca²⁺ dynamics: clinical perspectives. *Scandinavian cardiovascular journal*, 50(2), 65–77.
- Baba, Y., Hayashi, K., Fujii, Y., Mizushima, A., Watarai, H., Wakamori, M., ... Kurosaki, T. (2006). Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(45), 16704–16709.
- Bauer, M. C., O'Connell, D., Cahill, D. J., & Linse, S. (2008). Calmodulin binding to the polybasic C-termini of STIM proteins involved in store-operated calcium entry. *Biochemistry*, 47(23), 6089–6091.
- Bénard, L., Oh, J. G., Cacheux, M., Lee, A., Nonnenmacher, M., ... Hulot, J.-S. (2016). Cardiac Stim1 Silencing Impairs Adaptative Hypertrophy and Promotes Heart Failure Through Inactivation of mTORC2/Akt Signaling. *Circulation*, 133(15), 1458–1471.
- Bergsmann, J., Derler, I., Muik, M., Frischauf, I., Fahrner, M., ... Romanin, C. (2011). Molecular determinants within N terminus of Orai3 protein that control channel activation and gating. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(36), 31565–31575.
- Bernardo, B. C., Sapra, G., Patterson, N. L., Cemerlang, N., Kiriazis, H., Ueyama, T., ... McMullen, J. R. (2015). Long-Term Overexpression of Hsp70 Does Not Protect against Cardiac Dysfunction and Adverse Remodeling in a MURC Transgenic Mouse Model with Chronic Heart Failure and Atrial Fibrillation. *PloS One*, 10(12), e0145173.
- Bers, D. M., Cardiac excitation-contraction coupling. (2002). *Nature*, 415(6868), 198–205.
- Bhardwaj, R., Hediger, M. A., & Demarex, N. (2016). Redox modulation of STIM-ORAI Signaling. *Cell Calcium*, 60(2), 142–152.
- Bolotina, V. M. (2008). Orai, STIM1 and iPLA2beta: a view from a different perspective. *The Journal of Physiology*, 586(13), 3035–3042.
- Bolotina, V. M., & Csutora, P. (2005). CIF and other mysteries of the store-operated Ca²⁺-entry pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(7), 378–387.
- Bootman, M. D., Collins, T. J., Mackenzie, L., Roderick, H. L., Berridge, M. J., & Peppiatt, C. M. (2002). 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(10), 1145–1150.

- Bousquet, S. S.m Monet M., & Boulay, G. (2010). Protein kinase C-dependent phosphorylation of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) on serine 448 causes channel inhibition. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(52), 40534-40543.
- Brandman, O., Liou, J., Park, W. S., & Meyer, T. (2007) STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. *Cell*, 131(7), 1327-1339.
- Brazer, S.-C. W., Singh, B. B., Liu, X., Swaim, W., & Ambudkar, I. S. (2003). Caveolin-1 contributes to assembly of store-operated Ca²⁺ influx channels by regulating plasma membrane localization of TRPC1. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(29), 27208–27215.
- Bush, E. W., Hood, D. B., Papst, P. J., Chapo, J. A., Minobe, W., ... McKinsey, T. A. (2006). Canonical transient receptor potential channels promote cardiomyocyte hypertrophy through activation of calcineurin. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(44), 33487-33496.
- Campagnoni, A. T., Pribyl, T. M., Campagnoni, C. W., Kampf, K., Amur-Umarjee, S., ... Kitamura, K. (1993). Structure and developmental regulation of Golli-mbp, a 105-kilobase gene that encompasses the myelin basic protein gene and is expressed in cells in the oligodendrocyte lineage in the brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(7), 4930-4938.
- Cantero-Recasens, G., Fandos, C., Ruio-Moscardo, F., Valverde, M. A., & Vicente, R. (2010). The asthma-associated ORMDL3 gene product regulates endoplasmic reticulum-mediated calcium signaling and cellular stress. *Human Molecular Genetics*, 19(1), 111-121.
- Carrera-Suredas, A., Cantero-Recasens, G., Rubio-Moscardo, F., Kiefer, K., Peinelt, C., ... Vicente, R. (2013). ORMDL3 modulates store-operated calcium entry and lymphocyte activation. *Human Molecular Genetics*, 22(3), 519-530.
- Chaudhary, N., Gomez, G. A., Howes, M. T., Lo, H. P., McMahon, K.-A., Rae, J. A., ... Parton, R. G. (2014). Endocytic crosstalk: cavins, caveolins, and caveolae regulate clathrin-independent endocytosis. *PLoS Biology*, 12(4), e1001832.
- Cheng, J. P. X., & Nichols, B. J. (2016). Caveolae: One Function or Many? *Trends in Cell Biology*, 26(3), 177–189.
- Cheng, K. T., Liu, X., Ong, H. L., Swaim, W., & Ambudkar, I. S. (2011). Local Ca²⁺ entry via Orai1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca²⁺ signals required for specific cell functions. *PLoS biology*, 9(3), e1001025.
- Chiong, M., Parra, V., Eishner, V., Ibarra, C., Maldonado, C., ... Lavander0. S., (2010). Parallel activation of Ca(2+)-induced survival and death pathways in cardiomyocytes by sorbitol-induced hyperosmotic stress. *Apoptosis: An international Journal on Programmed Cell Death*, 15(8), 887-903.
- Choi-Rhee, E., Schulman, H., & Cronan, J. E. (2004). Promiscuous protein biotinylation by Escherichia coli biotin protein ligase. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 13(11), 3043–3050.
- Cooper, D. M. F. (2015). Store-operated Ca²⁺-entry and adenylyl cyclase. *Cell Calcium*, 58(4), 368–375. 87
- Cooper, D. M. F., & Crossthwaite, A. J. (2006). Higher-order organization and regulation of adenylyl cyclases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(8), 426–431.
- Csutora, P., Peter, K., Kilic, H., Park, K. M., Zarayskiy, V., Gwozdz, T., & Bolotina, V. M. (2008). Novel role for STIM1 as a trigger for calcium influx factor production. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(21), 14524–14531.

- Darbellay, B., Arnaudeau, S., Bader, C. R., König, S. & Bernheim, L. (2011). STIM1L is a new actin-binding splice variant involved in fast repetitive Ca²⁺ release. *The Journal of Cell Biology*, 194(2), 335-346.
- Darbellay, B., Arnaudeau, S., Ceroni, D., Bader, C. R., König, S., & Bernheim, L. (2010). Human muscle economy myoblast differentiation and excitation-contraction coupling use the same molecular partners, STIM1 and STIM2. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22437–22447.
- Derler, I., Fahrner, M., Muik, M., Lackner, B., Schindl, R., Groschner, K., & Romanin, C. (2009). A Ca²⁺-release-activated Ca²⁺ (CRAC) modulatory domain (CMD) within STIM1 mediates fast Ca²⁺-dependent inactivation of ORAI1 channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(37), 24933-24938.
- Dewenter, M., Von der Lieth, A., Katus, H. A., & Backs, Johannes. (2017). Calcium Signaling and Transcriptional Regulation in Cardiomyocytes. *Circulation Research*, 121(8), 1000-1020.
- Dominguez-Rodriguez, A., Ruiz-Hurtado, G., Sabourin, J., Gomez, A. M., Alvarez, J. L., & Benitah, J.-P. (2015). Proarrhythmic effect of sustained EPAC activation on TRPC3/4 in rat ventricular cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 87, 74-78.
- Duchen, M. R. (1999). Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signaling and cell death. *The Journal of Physiology*, 516(1), 1-17.
- Endo, Y., Noguchi, S., Hara, Y., Hayashi, Y. K., Motomura, K., ... Nishino, I. (2015) Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Human Molecular Genetics*, 24(3), 637-648.
- Eisner, D. A., Caldwell, J. L., Kistamas, K., & Trafford, A. W. (2017). Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circulation Research*, 121(2), 181-195.
- Faggi, F., Codenotti, S., Poliani, P. L., Cominelli, M., Chiarelli, N., Colombi, M., ... Fanzani, A. (2015). MURC/cavin-4 Is Co-Expressed with Caveolin-3 in Rhabdomyosarcoma Tumors and Its Silencing Prevents Myogenic Differentiation in the Human Embryonal RD Cell Line. *PLoS One*, 10(6), e0130287.
- Fahrner, M., Muik, M., Schindl, R., Butorac, C., Stathopoulos, P., ... Romanin, C. (2014). A coiled-coil clamp controls both conformation and clustering of stromal interaction molecule 1 (STIM1). *The Journal of Biological Chemistry*, 289(48), 33231-33244.
- Feng, J.-M., Hu, Y. K., Xie, L.-H., Colwell, C. S., Shao, X. M., ... Campagnoni, A. T. (2006). Golgi protein negatively regulates store depletion-induced calcium influx in T cells. *Immunity*, 24(6), 717-727.
- Feng, M., Grice, D. M., Faddy, H. M., Nguyen, N., Leitch, S., Wang, Y., ... Rao, R. (2010). Store-independent activation of Orail by SPCA2 in mammary tumors. *Cell*, 143(1), 84–98.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.-H., Tanasa, B., ... Rao, A. (2006). A mutation in Orail causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441(7090), 179–185.
- Frischauf, I., Schindl, R., Bergsmann, J., Derler, I., Fahrner, M., ... Romanin, C. (2011). Cooperativeness of Orail cytosolic domains tunes subtype-specific gating. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(10), 8577-8584.

- de la Fuente, S., Fonteriz, R. I., Montero, M., & Alvarez, J. (2012). Dynamics of mitochondrial $[Ca^{2+}]$ measured with the low- Ca^{2+} -affinity dye rhod-5N. *Cell Calcium*, 51(1), 65-71.
- Fukushima, M., Tomita, T., Janoshazi, A., & Putney, J. W. (2012). Alternative translation initiation gives rise to two isoforms of Orail with distinct plasma membrane mobilities. *Journal of Cell Science*, 125(18), 4354-4361.
- Galbiati, F., Engelman, J. A., Volonte, D., Zhang, X. L., Minetti, C., Li, M., ... Lisanti, M. P. (2001). Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 21425-21433.
- Gambin, Y., Ariotti, N., McMahon, K.-A., Bastiani, M., Sierrecki, E., Kovtun, O., ... Parton, R. G. (2013). Single-molecule analysis reveals self assembly and nanoscale segregation of two distinct cavin subcomplexes on caveolae. *ELife*, 3, e01434.
- Gao, M. H., Lai, N. C., Roth, D. M., Zhou, J., Zhu, J., Anzai, T., ... Hammond, H. K. (1999). Adenylylcyclase increases responsiveness to catecholamine stimulation in transgenic mice. *Circulation*, 99(12), 1618-1622.
- Gao, M., Ping, P., Post, S., Insel, P. A., Tang, R., & Hammond, H. K. (1998). Increased expression of adenylylcyclase type VI proportionately increases beta-adrenergic receptor-stimulated production of cAMP in neonatal rat cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(3), 1038-1043.
- Garcia, R. L., & Schilling, W. P. (1997). Differential expression of mammalian TRP homologues across tissues and cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239(1), 279-283.
- García-Cardena, G., Martasek, P., Masters, B. S., Skidd, P. M., Couet, J., Li, S., ... Sessa, W. C. (1997). Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(41), 25437-25440.
- Gazzerro, E., Sotgia, F., Bruno, C., Lisanti, M. P., & Minetti, C. (2010). Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 18(2), 137-145.
- Goetz, J. G., Minguet, S., Navarro-Lérida, I., Lazcano, J. J., Samaniego, R., Calvo, E., ... Del Pozo, M. A. (2011). Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell*, 146(1), 148-163. 88
- González-Cobos, J. C., Zhang, X., Zhang, W., Ruhle, B., Motiani, R. K., Schindl, R., ... Trebak, M. (2013). Store-independent Orail/3 channels activated by intracrine leukotriene C4: role in neointimal hyperplasia. *Circulation Research*, 112(7), 1013-1025.
- Grigoriev, I., Gouveia, S. M., van der Vaart, B., Demmers, J., Smyth, J. T., Honnappa, S., ... Akhmanova, A. (2008). STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Current Biology: CB*, 18(3), 177-182.
- Gross, S. A., Wissenbach, U., Philipp, S. E., Freichel, M., Cavalié, A., & Flockerzi, V. (2007). Murine ORAI2 splice variants form functional Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(27), 19375-19384.
- Gwack, Y., Srikanth, S., Feske, S., Cruz-Guilloty, F., Oh-hora, M., Neems, D. S., ... Rao, A. (2007). Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(22), 16232-16243.

- Halls, M. L., & Cooper, D. M. F. (2017). Adenylyl cyclase signalling complexes - Pharmacological challenges and opportunities. *Pharmacology & Therapeutics*, 172, 171–180.
- Hammond, H. K., Penny, W. F., Traverse, J. H., Henry, T. D., Watkins, M. W., Yancy, C. W., ... Gao, M. H. (2016). Intracoronary Gene Transfer of Adenylyl Cyclase 6 in Patients With Heart Failure: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiology*, 1(2), 163–171.
- Hansen, C. G., & Nichols, B. J. (2010). Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends in Cell Biology*, 20(4), 177–186.
- Hansen, C. G., Howard, G., & Nichols, B. J. (2011). Pacsin 2 is recruited to caveolae and functions in caveolar biogenesis. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 16), 2777–2785.
- Hayer, A., Stoeber, M., Bissig, C., & Helenius, A. (2010). Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 11(3), 361–382.
- Head, B. P., Patel, H. H., Roth, D. M., Murray, F., Swaney, J. S., Niesman, I. R., ... Insel, P. A. (2006). Microtubules and actin microfilaments regulate lipid raft/caveolae localization of adenylyl cyclase signaling components. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26391–26399.
- Hidaka, H., Sasaki, Y., Tanaka, T., Endo, T., Onho, S., Fujii, Y., & Nagata, T. (1981). N-(6-aminoethyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(7), 4354–4357.
- Hou, X., Pedi, L., Diver, M. M., & Long, S. B. (2012). Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science*, 338(6112), 1308–1313.
- Housley, M. P., Njaine, B., Ricciardi, F., Stone, O. A., Hölper, S., Krüger, M., ... Stainier, D. Y. R. (2016). Cavin4b/Murcb Is Required for Skeletal Muscle Development and Function in Zebrafish. *PLoS Genetics*, 12(6), e1006099.
- Huang, G. N., Zeng, W., Kim, J. Y., Yuan, J. P., Han, L., Muallem, S., & Worley, P. F. (2006) STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *INature Cell Biology*, 8(9), 1003–1010.
- Hulot, J.-S., Fauconier J., Ramanujam, D., Chaanine A., Aubart, F., ... Engelhardt S. (2011). Critical role of stromal interaction molecule 1 in cardiac hypertrophy. *Circulation*, 124(7), 796–805.
- Hung, V., Udeshi, N. D., Lam, S. S., Loh, K. H., Cox, K. J., Pedram, K., ... Ting, A. Y. (2016). Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2. *Nature Protocols*, 11(3), 456–475.
- Ithychanda, S. S., Hsu, D., Li, H., Yan, L., Liu, D. D., Liu, D., ... Qin, J. (2009). Identification and characterization of multiple similar ligand-binding repeats in filamin: implication on filamin-mediated receptor clustering and cross-talk. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(50), 35113–35121.
- Janowski, E., Berrios, M., Cleeman, L., & Morad, M., (2010). Developmental aspects of cardiac Ca²⁺ signaling: interplay between RyR- and IP3R-gated Ca²⁺ stores. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 298(6), H1939–1950.
- Jardín, I., Albarran, L., Salido, G. M., López, J. J., Sage, S. O., & Rosado, J. A. (2018). Fine-tuning of store-operated calcium entry by fast and slow Ca²⁺-dependent inactivation: Involvement of SARAF. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1865(3), 463–469.

- Jardin, I., Lopez, J. J., Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2008). Orail mediates the interaction between STIM1 and hTRPC1 and regulates the mode of activation of hTRPC1-forming Ca^{2+} channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(37), 25296-25304.
- Jha, A., Ahuja, M., Maléth, J., Moreno, C. M., Yuan, J. P., Kim, M. S., & Muallem, S. (2013). The STIM1 CTID domain determines access of SARAF to SOAR to regulate Orail channel function. *The Journal of Cell Biology*, 202(1), 71–79. 89.
- Ji, Y., Guo, X., Zhang, Z., Huang, Z., Zhu, J., Chan, Q.-H., & Gui, L. (2017) CaMKIIdelta mediates phenylephrine induced cardiomyocyte hypertrophy through store-operated Ca^{2+} entry. *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 27, 9-17.
- Jing, J., He, L., Sun, A., Quintana, A., Ding, Y., Ma, G., ... Zhou, Y. (2015). Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca^{2+} influx. *Nature Cell Biology*, 17(10), 1339–1347.
- Kassan, M., Ait-Aissar, K., Radwan, E., Mali, V., Haddox, S., ... Matrougui, K. (2016). Essential Role of Smooth Muscle STIM1 in Hypertension and Cardiovascular Dysfunction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(9), 1900-1909.
- Kawasaki, T., Lange, I., & Feske, S. (2009). A minimal regulatory domain in the C terminus of STIM1 binds to and activates ORAI1 CRAC channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385(1), 49-54.
- Kawasaki, T., Ueyama, T., Lange, I., Feske, S., & Saito, N. (2010). Protein kinase C-induced phosphorylation of Orail regulates the intracellular Ca^{2+} level via the store-operated Ca^{2+} channel. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25720–25730.
- Kim, J. Y., & Saffen, D. (2005). Activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors stimulates the formation of a multiprotein complex centered on TRPC6 channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 32035–32047.
- Kirschmer, N., Bandleaon, S., Von Ehrlich-Treuenst  tt, V., Hartmann, S., Schaaf, A., ... Eder, P. (2016) TRPC4   and TRPC4   Similarity Affect Neonatal Cardiomyocyte Survival during Chronic GPCR Stimulation. *PloS One*, 11(12), e0168446.
- Kitajima, N., Numaga-Tomita, T., Watanabe, M., Kuroda, T., Nishimura, A., Miyano, K., ... Nishida, M. (2016). TRPC3 positively regulates reactive oxygen species driving maladaptive cardiac remodeling. *Scientific Reports*, 6, 37001.
- Kraft, R. (2015). STIM and ORAI proteins in the nervous system. *Channels*, 9(5), 245-252.
- Koubassova, N. A. & Tsaturyan, A. K. (2011). Molecular mechanism of actin-myosin motor in muscle. *Biochemistry, Biokhimiia*, 76(13), 1484-1506.
- Kovtun, O., Tillu, V. A., Jung, W., Leneva, N., Ariotti, N., Chaudhary, N., ... Collins, B. M. (2014). Structural insights into the organization of the caveolin membrane coat complex. *Developmental Cell*, 31(4), 405–419.
- Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Stotz, S. C., Manasian, Y., & Clapham, D. E. (2011). POST, partner of stromal interaction molecule 1 (STIM1), targets STIM1 to multiple transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(48), 19234–19239.
- Kuwahara, K., Wang, Y., McAnally, J. A., Bassel-Duby, R., Hill, J. A., & Olson, E. N. (2006). TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(12), 3114-3126.
- Kwiatek, A. M., Minshall, R. D., Cool, D. R., Skidgel, R. A., Malik, A. B., & Tiruppathi, C. (2006). Caveolin-1 regulates store-operated Ca^{2+} influx by binding of its

- scaffolding domain to transient receptor potential channel-1 in endothelial cells. *Molecular Pharmacology*, 70(4), 1174–1183.
- Lai, N. C., Roth, D. M., Gao, M. H., Fine, S., Head, B. P., Zhu, J., ... Hammond, H. K. (2000). Intracoronary delivery of adenovirus encoding adenylyl cyclase VI increases left ventricular function and cAMP-generating capacity. *Circulation*, 102(19), 2396–2401.
- Lai, N. Chin, Roth, D. M., Gao, M. H., Tang, T., Dalton, N., Lai, Y. Y., ... Hammond, H. K. (2004). Intracoronary adenovirus encoding adenylyl cyclase VI increases left ventricular function in heart failure. *Circulation*, 110(3), 330–336.
- Li, S., Couet, J., & Lisanti, M. P. (1996). Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(46), 29182–29190.
- Li, X., Wu, G., Yang, Y., Fu, S., Liu, X., ... Shen, Y. (2017). Calmodulin dissociates the STIM1-Orai1 complex and STIM1 oligomers. *Nature Communications*, 8(1), 1042.
- Lim, Y.-W., Lo, H. P., Ferguson, C., Martel, N., Giacomotto, J., Gomez, G. A., ... Parton, R. G. (2017). Caveolae Protect Notochord Cells against Catastrophic Mechanical Failure during Development. *Current Biology: CB*, 27(13), 1968-1981.e7.
- Liou, J., Fivaz, M., Inoue, T., & Meyer, T. (2007) Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(22), 9301-9306.
- Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A., & Penner, R. (2007). CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties. *Current biology*, 17(9), 794-800.
- Litjens, T., Harland, M. L., Roberts, M. L., Barrit, G. J., & Rychkov, G. Y. (2004). Fast Ca(2+)-dependent inactivation of the store-operated Ca²⁺ current (ISOC) in liver cells: a role for calmodulin. *The Journal of Physiology*, 558(1), 85-97.
- Liu, L., Brown, D., McKee, M., Lebrasseur, N. K., Yang, D., Albrecht, K. H., ... Pilch, P. F. (2008). Deletion of Cavin/PTRF causes global loss of caveolae, dyslipidemia, and glucose intolerance. *Cell Metabolism*, 8(4), 310–317
- Lockwich, T. P., Liu, X., Singh, B. B., Jadlowiec, J., Weiland, S., & Ambudkar, I. S. (2000). Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin- scaffolding lipid raft domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(16), 11934– 11942. 90
- Lopez, J. J., Albarran, L., Gomez, L. J., Smani, T., Salido, G. M., & Rosado, J., A. (2016). Molecular modulators of store-operated calcium entry. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1863(8), 2037-2043.
- Lopez, J. J., Albarrán, L., Jardín, I., Sanchez-Collado, J., Redondo, P. C., Bermejo, N., ... Rosado, J. A. (2018). Filamin A Modulates Store-Operated Ca²⁺ Entry by Regulating STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1)-Orai1 Association in Human Platelets. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(2), 386–397.
- Lu, J., McKinsey, T. A., Nicol, R. L., & Olson, E. N., (2000), Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 4070-4075.
- Ludwig, A., Howard, G., Mendoza-Topaz, C., Deerinck, T., Mackey, M., Sandin, S., ... Nichols, B. J. (2013). Molecular composition and ultrastructure of the caveolar coat complex. *PLoS Biology*, 11(8), e1001640.

- Luik, R. M., Wu, M. M., Buchanan, J., & Lewis, R. S. (2006). The elementary unit of store-operated Ca^{2+} entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma Membrane junctions. *The Journal of Cell Biology*, 174(6), 815-825.
- Luo, D., Broad, L. M., Bird, G. S., & Putney, J. W. (2001). Mutual antagonism of calcium entry by capacitative and arachidonic acid-mediated calcium entry pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 20186–20189.
- Luo, X., Hojaye, B., Jiang, N., Wang, Z. V., Tandan, S., Rakalin, A., ... Hill, J. A. (2012). STIM1-dependent store-operated Ca^{2+} entry is required for pathological cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(1), 136–147.
- Ma, Q., Ye, L., Liu, H., Shi, Y., & Zhou, N. (2017). An overview of Ca^{2+} mobilization assays in GPCR drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(5), 511-523.
- Makarewich, C. A., Zhang, H., Davis, J., Correll, R. N., Trappanese, D. M., ... Houser, S.R. (2014) Transient receptor potential channels contribute to pathological structural and functional remodeling after myocardial infarction. *Circulation Research*, 115(6), 567-580.
- Maléth, J., Choi, S., Muallem, S., & Ahuja, M. (2014). Translocation between PI(4,5)P2-poor and PI(4,5)P2-rich microdomains during store depletion determines STIM1 conformation and Orai1 gating. *Nature Communications*, 5, 5843.
- Martin, D. D. O., Beauchamp, E., & Berthiaume, L. G. (2011). Post-translational myristoylation : Fat matters in cellular life and death. *Biochimie*, 93(1), 18-31.
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L., & Olson, E. N., (2001). Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class II histone deacetylases. *Molecular and Cellular Biology*, 21(18), 6312-6321.
- McNally, B. A., Somasundaram, A., Jairaman, A., Yamashita, M., & Prakriya, M. (2013). The C- and N-terminal STIM1 binding sites on Orai1 are required for both trapping and gating CRAC channels. *The Journal of Physiology*, 591(11), 2833-2850.
- Mercer, J. C., Dehaven, W. I., Smyth, J. T., Wedel, B., Boyles, R. R., Bird, G. S., & Putney, J. W. (2006). Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(34), 24979-24990.
- Merritt, J. E., Armstrong, W. P., Benham, C. D., Hallam, T. J., Jacob, R., Jaxa-Chamiec, A., ... Rink, T. J. (1990). SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *The Biochemical Journal*, 271(2), 515–522.
- Miao, L., Wei, D., Zhang, Y., Liu, J., Lu, S., Zhang, A., & Huang, S. (2016). Effects of stromal interaction molecule 1 or Orai overexpression on the associated proteins and permeability of podocytes. *Nephrology*, 21(11), 959-967.
- Mignen, O., & Shuttleworth, T. J. (2000). I(ARC), a novel arachidonate-regulated, noncapacitative Ca^{2+} entry channel. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9114-9119.
- Mignen, Olivier, Thompson, J. L., & Shuttleworth, T. J. (2007). STIM1 regulates Ca^{2+} entry via arachidonate-regulated Ca^{2+} -selective (ARC) channels without store depletion or translocation to the plasma membrane. *The Journal of Physiology*, 579(Pt 3), 703–715.
- Mignen, Olivier, Thompson, J. L., & Shuttleworth, T. J. (2008). Both Orai1 and Orai3 are essential components of the arachidonate-regulated Ca^{2+} -selective (ARC) channels. *The Journal of Physiology*, 586(1), 185–195.

- Mignen, Olivier, Thompson, J. L., & Shuttleworth, T. J. (2009). The molecular architecture of the arachidonate-regulated Ca^{2+} -selective ARC channel is a pentameric assembly of Orai1 and Orai3 subunits. *The Journal of Physiology*, 587(Pt 17), 4181–4197.
- Miyagawa, K., Ogata, T., Ueyama, T., Kasahara, T., Nakanishi, N., Naito, D., ... Matoba, S. (2017). Loss of MURC/Cavin-4 induces JNK and MMP-9 activity enhancement in vascular smooth muscle cells and exacerbates abdominal aortic aneurysm. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 487(3), 587–593.
- Molkentin, J. D., Lu, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R., & Olson, E. N. (1998). Calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*, 93(2), 215–228.
- Montero, M., Lobaton, C. D., Hernandez-sanmiguel, E., Santodomingo, J., Vay, L., Moreno, A., & Alvarez, J. (2004). Direct activation of the mitochondrial calcium uniporter by natural plant flavonoids. *The Biochemical Journal*, 384(1), 19–24.
- Motiani, R. K., Tanwar, J., Raja, D. A., Vashisht, A., Khanna, S., Sharma, S., ... Gokhale, R. S. (2018). STIM1 activation of adenylyl cyclase 6 connects Ca^{2+} and cAMP signaling during melanogenesis. *The EMBO Journal*, 37(5).
- Mullins, F. M., Park, C. Y., Dolmetsch, R. E., & Lewis, R. S. (2009). STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca^{2+} -dependent inactivation of CRAC channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36), 15495–15500.
- Nagai, T., Sawano, A., Park, E. S., & Miyawaki, A. (2001). Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca^{2+} . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6), 3197–3202.
- Naito, D., Ogata, T., Hamaoka, T., Nakanishi, N., Miyagawa, K., Maruyama, N., ... Ueyama, T. (2015). The coiled-coil domain of MURC/cavin-4 is involved in membrane trafficking of caveolin-3 in cardiomyocytes. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 309(12), H2127–2136.
- Nakamura, T., Ranek, M. J., Lee, D. I., Shalkey Hahn, V., Kim, C., Eaton, P., & Kass, D. A. (2015). Prevention of PKG1 α oxidation augments cardioprotection in the stressed heart. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(6), 2468–2472. 91
- Nakanishi, N., Ogata, T., Naito, D., Miyagawa, K., Taniguchi, T., Hamaoka, T., ... Ueyama, T. (2016). MURC deficiency in smooth muscle attenuates pulmonary hypertension. *Nature Communications*, 7, 12417.
- Nakayama, H., Wilkin, B. J., Bodi, I., & Molkentin, J. D. (2006). Calcineurin-dependent cardiomyopathy is activated by TRPC in the adult mouse heart. *FASEB journal*, 20(10), 1660–1670.
- Nesin, V., Wiley, G., Kousi, M., Ong, E.-C., Lehmann, T., ... Tsiokas, L. (2014). Activating mutations in STIM1 and ORAI1 cause overlapping syndromes of tubular myopathy and congenital miosis. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(11), 4197–4202.
- Nguyen, N., Biet, M., Simard, E., Béliveau, E., Francoeur, N., Guillemette, G., ... Boulay, G. (2013). STIM1 participates in the contractile rhythmicity of HL-1 cells by moderating T-type Ca^{2+} channel activity. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1833(6), 1294–1303.
- Nystrom, F. H., Chen, H., Cong, L. N., Li, Y., & Quon, M. J. (1999). Caveolin-1 interacts with the insulin receptor and can differentially modulate insulin signaling in transfected Cos-7 cells and rat adipose cells. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 13(12), 2013–2024.

- Ogata, T., Naito, D., Nakanishi, N., Hayashi, Y. K., Taniguchi, T., Miyagawa, K., ... Ueyama, T. (2014). MURC/Cavin-4 facilitates recruitment of ERK to caveolae and concentric cardiac hypertrophy induced by α 1-adrenergic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(10), 3811–3816.
- Ogata, T., Ueyama, T., Isodono, K., Tagawa, M., Takehara, N., Kawashima, T., ... Oh, H. (2008). MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein that modulates the Rho/ROCK pathway, induces cardiac dysfunction and conduction disturbance. *Molecular and Cellular Biology*, 28(10), 3424–3436.
- Oh, P., McIntosh, D. P., & Schnitzer, J. E. (1998). Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *The Journal of Cell Biology*, 141(1), 101–114.
- Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Sato, T., Ono, K., & Ito, H. (2009). Essential role of STIM1 in the development of cardiomyocyte hypertrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 389(1), 172–176.
- Ong, H. L., Chang, K. T., Liu, X., Bandyopadhyay, B. C., Paria, B. C., ... Ambudkar, I. S. (2007). Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 9105–9116.
- Paez, P. M., Spreuer, V., Handley, V., Feng, J.-M., Campagnoni, C., & Campagnoni, A. T. (2007). Increased expression of golgi myelin basic proteins enhances calcium influx into oligodendroglial cells. *The Journal of Neuroscience*, 27(46), 12690–12699.
- Palty, R., Raveh, A., Kaminsky, I., Meller, R., & Reuveny, E. (2012). SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling. *Cell*, 149(2), 425–438.
- Pani, B., Ong, H. L., Brazer, S.-C. W., Liu, X., Rauser, K., Singh, B. B., & Ambudkar, I. S. (2009). Activation of TRPC1 by STIM1 in ER-PM microdomains involves release of the channel from its scaffold caveolin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(47), 20087–20092.
- Pani, B., Ong, H. L., Liu, X., Rauser, K., Ambudkar, I. S., & Singh, B. B. (2008). Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca^{2+} entry (SOCE). *The Journal of Biological Chemistry*, 283(25), 17333–17340.
- Pani, B., & Singh, B. B. (2009). Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling. *Cell Calcium*, 45(6), 625–633.
- Park, C. Y., Hoover, P. J., Mullins, F. M., Bachhawat, P., Covington, E. D., ... Lewis, J. S. (2009). STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell*, 136(5), 876–890.
- Park, C. Y., Shcheglovitov, A., & Dolmetsch, R. (2010) The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels. *Science*, 330(6000), 101–105.
- Parks, C., Alam, M. A., Sullivan, R., & Mancarella S. (2016) STIM1-dependent Ca^{2+} microdomains are required for myofilament remodeling and signaling in the heart. *Scientific Reports*, 6, 25372.
- Parvez, S., Beck, A., Peinelt, C., Soboloff, J., Lis, A., ... Penner, R. (2008). STIM2 protein mediates distinct store-dependent and store-independent modes of CRAC channel activation. *FASEB journal*, 22(3), 752–761.

- Patel, H. H., Murray, F., & Insel, P. A. (2008). Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48, 359–391.
- Penna, A., Demuro, A., Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Safrina, O. Parker, I., & Cahalan, M. D. (2008). The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature*, 456(7218), 116–120.
- Putney, J. W. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7(1), 1–12.
- Ritchie, M. F., Samakai, E., & Soboloff, J. (2012). STIM1 is required for attenuation of PMCA-mediated Ca²⁺ clearance during T-cell activation. *The EMBO Journal*, 31(5), 1123–1133.
- Rodriguez, G., Ueyama, T., Ogata, T., Czernuszewicz, G., Tan, Y., Dorn, G. W., ... Marian, A. J. (2011). Molecular genetic and functional characterization implicate muscle-restricted coiled-coil gene (MURC) as a causal gene for familial dilated cardiomyopathy. *Circulation. Cardiovascular Genetics*, 4(4), 349–358. 92
- Rogers, S., Wells, R., & Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science (New York, N.Y.)*, 234(4774), 364–368.
- Ross, G. R., Bajwa, T., Edwards, S., Emelyanova, L., Rizvi, F., ... Jahangir, A. (2017). Enhanced store-operated Ca²⁺ influx and ORAI1 expression in ventricular fibroblasts from human failing heart. *Biology Open*, 6(3), 326–332.
- Roth, D. M., Gao, M. H., Lai, N. C., Drumm, J., Dalton, N., Zhou, J. Y., ... Hammond, H. K. (1999). Cardiac-directed adenylyl cyclase expression improves heart function in murine cardiomyopathy. *Circulation*, 99(24), 3099–3102.
- Roth, David M., Bayat, H., Drumm, J. D., Gao, M. H., Swaney, J. S., Ander, A., & Hammond, H. K. (2002). Adenylyl cyclase increases survival in cardiomyopathy. *Circulation*, 105(16), 1989–1994.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., & Anderson, R. G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 68(4), 673–682.
- Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M., & Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*, 196(6), 801–810.
- Sabourin, J., Bartoli, F., Antigny, F., Gomez, A. M., & Benitah, J.-P. (2016). Transient Receptor Potential Canonical (TRPC)/Orai1-dependent Store-operated Ca²⁺ Channels: NEW TARGETS OF ALDOSTERONE IN CARDIOMYOCYTES. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(25), 13394–13409.
- Saliba, Y., Keck, M., Marchand, A., Atassi, F., Ouillé, A., ... Lompré, A.-M. (2015). Emergence of Orai3 activity during cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research*, 105(3), 248–259.
- Scherer, P. E., Okamoto, T., Chun, M., Nishimoto, I., Lodish, H. F., & Lisanti, M. P. (1996). Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(1), 131–135.
- Schindl, R., Bergsmann, J., Frischauf, I., Derler, I., Fahrner, M., Muik, M., ... Romanin, C. (2008). 2-aminoethoxydiphenyl borate alters selectivity of Orai3 channels by increasing their pore size. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(29), 20261–20267.

- Schindl, R., Frischauf, I., Bergsmann, J., Muik, M., Derler, I., ... Romanin, C. (2009). Plasticity in Ca^{2+} selectivity of Orail/Orai3 heteromeric channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(46), 19623-19628.
- Scrimgeour, N., Litjens, T., Ma, L., Barritt, G. J., & Rychkov, G. Y. (2009). Properties of Orail mediated store-operated current depend on the expression levels of STIM1 and Orail proteins. *The Journal of Physiology*, 587(12), 2903-2918.
- Senju, Y., Itoh, Y., Takano, K., Hamada, S., & Suetsugu, S. (2011). Essential role of PACSIN2/syndapin-II in caveolae membrane sculpting. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 12), 2032-2040.
- Seo, K., Rainer, P. P., Shalkey Hahn, V., Lee, D.-I., Jo, S.-H., ... Kass, D. A. (2014). Combined TRPC3 and TRPC6 blockade by selective small molecule of genetic deletion inhibits pathological cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(4), 1551-1556.
- Sharma, S., Quintana, A., Findlay, G. M., Mettlen, M., Baust, B., Jain, M., ... Hogan, P. G. (2013). An siRNA screen for NFAT activation identifies septins as coordinators of store-operated Ca^{2+} entry. *Nature*, 499(7457), 238-242.
- Shuttleworth, T. J., Thompson, J. L., & Mignen, O. (2004). ARC channels: a novel pathway for receptor-activated calcium entry. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 19, 355-361.
- Shyu, K.-G., Cheng, W.-P., Wang, B.-W., & Chang, H. (2014). Hypoxia activates muscle-restricted coiled-coil protein (MURC) expression via transforming growth factor- β in cardiac myocytes. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 126(5), 367-375.
- Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1(1), 31-39.
- Smaardijk, S., Chen, J., Kerselaers, S., Voets, T., Eggermont, J., & Vangheluwe, P. (2018). Store-independent coupling between the Secretory Pathway Ca^{2+} transport ATPase SPCA1 and Orail in Golgi stress and Hailey-Hailey disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1865(6), 855-862. 93
- Smani, T., Zakharov, S. I., Csutora, P., Leno, E., Trepakova, E. S., & Bolotina, V. M. (2004). A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nature Cell Biology*, 6(2), 113-120.
- Smyth, J. T., DeHaven, W. I., Bird, G. S., & Putney, J. W. (2007). Role of the microtubule cytoskeleton in the function of the store-operated Ca^{2+} channel activator STIM1. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 21), 3762-3771.
- Smyth, J. T., Petrankska, J. G., Boyles, R. R., DeHaven, W. I., Fukushima, M., Johnson, K. L., ... Putney, J. W. (2009). Phosphorylation of STIM1 underlies suppression of store-operated calcium entry during mitosis. *Nature Cell Biology*, 11(12), 1465-1472.
- Soboloff, J., Gligorijevic, B., & Zaidi, M. R. (2018). STIM1 (c)AMPs up melanogenesis. *The EMBO Journal*, 37(5).
- Soboloff, J., Rothberg, B. S., Madesh, M., & Gill, D. L. (2012) STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nature Reviews. Molecular Cell Biolgy*, 13(9), 549-565.
- Soboloff, J., Spassova, M. A., Hewavitharana, T., He, L.-P., Xu, W., Johnstone, L. S., ... Gill, D. L. (2006). STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca^{2+} Entry. *Current Biology: CB*, 16(14), 1465-1470.
- Solaro, R. J. & Rarick, H. M. (1998). Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circulation Research*, 83(5), 471-480.
- Song, K. S., Li Shengwen, null, Okamoto, T., Quilliam, L. A., Sargiacomo, M., & Lisanti, M. P. (1996). Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral

- membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(16), 9690–9697.
- Srikanth, S., Jung, H.-J., Kim, K.-D., Souda, P., Whitelegge, J., & Gwack, Y. (2010). A novel EF-hand protein, CRACR2A, is a cytosolic Ca^{2+} sensor that stabilizes CRAC channels in T cells. *Nature Cell Biology*, 12(5), 436–446.
- Stoeber, M., Stoeck, I. K., Hänni, C., Bleck, C. K. E., Balistreri, G., & Helenius, A. (2012). Oligomers of the ATPase EHD2 confine caveolae to the plasma membrane through association with actin. *The EMBO Journal*, 31(10), 2350–2364.
- Tagawa, M., Ueyama, T., Ogata, T., Takehara, N., Nakajima, N., Isodono, K., ... Oh, H. (2008). MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein, is involved in the regulation of skeletal myogenesis. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 295(2), C490–498.
- Tang, Z., Scherer, P. E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D. S., ... Lisanti, M. P. (1996). Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(4), 2255–2261.
- Thompson, J. L., & Shuttleworth, T. J. (2012). A plasma membrane-targeted cytosolic domain of STIM1 selectivity activates ARC channels, an arachidonate-regulated store-independent Orai channel. *Channels*, 6(5), 370–378.
- Torok, K., Cowley, D. J., Brandmeier, B. D., Howell, S., Aitken, A., & Trentham, D. R. (1998). Inhibition of calmodulin-activated smooth-muscle myosin light-chain kinase by calmodulin-binding peptides and fluorescent (phosphodiesterase-activating) calmodulin derivatives. *Biochemistry*, 37(17), 6188–6198.
- Uehara, A., Yasukochi, M., Imanaga, I., Nishi, M., & Takeshima, H. (2002). Store-operated Ca^{2+} entry uncoupled with ryanodine receptor and junctional membrane complex in heart muscle cells. *Cell Calcium*, 31(2), 89–96.
- Venkatachalam, K., Zheng, F., & Gill, D. L. (2003). Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(31), 29031–29040.
- Walsh, C. M., Doherty, M. K., Tepikin, A. V., & Burgoyne, R. D. (2010). Evidence for an interaction between Golgi and STIM1 in store-operated calcium entry. *The Biochemical Journal*, 430(3), 453–460.
- Wang, Y., Li, Z. C., Zhang, P., Poon, E., Kong, C. W., Boheler, K. R., ... Yao, X. (2015). Nitric Oxide-cGMP-PKG Pathway Acts on Orai1 to Inhibit the Hypertrophy of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 33(10), 2973–2984.
- Wang, Y., Deng, X., Mancarella, S., Hendron, E., Eguchi, S., ... Gill, D. L. (2010). The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and $\text{CaV}1.2$ channels. *Science*, 330(6000), 105–109.
- Way, M., & Parton, R. G. (1995). M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Letters*, 376(1–2), 108–112.
- Wen, J., Huang, Y.-H., Xiu, H.-H., Shan, Z.-M., & Xu, K.-Q. (2016). Altered expression of stromal interaction molecule (STIM)-calcium release-activated calcium channel protein (ORAI) and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP3Rs) in cancer: will they become a new battlefield for oncotherapy? *Chinese Journal of Cancer*, 35, 32.
- Wilson, L. A., McKeown, L., Tumova, S., Li, J., & Beech, D. J. (2015). Expression of a long variant of CRACR2A that belongs to the Rab GTPase protein family in 94

- endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456(1), 398–402.
- Wissenbach, U., Philipp, S. E., Gross, Sé A., Cavalié, A., & Flockerzi, V. (2007). Primary structure, chromosomal localization and expression in immune cells of the murine ORAI and STIM genes. *Cell Calcium*, 42(4-5), 439-446.
- Wu, X., Eder, P., Chang, B., & Molkentin, J. D. (2010) TRPC channels are necessary mediators of pathologic cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(15), 7000-7005.
- Xia, J., Wang, H., Huang, H., Sun, L., & Dong, S. (2016) Elevated Orai1 and STIM1 expressions upregulate MACC1 expression to promote tumor cell proliferation, metabolism, migration, and invasion in human gastric cancer. *Cancer Letters*, 381(1), 31-40.
- Yang, J., Wagner, S. A., & Beli, P. (2015). Illuminating Spatial and Temporal Organization of Protein Interaction Networks by Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Frontiers in Genetics*, 6, 344.
- Yuan, J. P., Zeng, W., Dorwart, M. R., Choi, Y.-J., Worley, P. F., & Muallem, S. (2009). SOAR and the polybasic STM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nature Cell Biology*, 11(3), 337-343.
- Zeiger, W., Ito, D., Swetlik, C., Oh-hora, M., Villereal, M. L., & Thinakaran, G. (2011). Stanniocalcin 2 is a negative modulator of store-operated calcium entry. *Molecular and Cellular Biology*, 31(18), 3710–3722.
- Zhang, B., Jiang, J., Yue, Z., Liu, S., Ma, Y., ... Liu, P. (2016) Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE) contributes to angiotensin II-induced cardiac fibrosis in cardiac fibroblasts. *Journal of Pharmacological Sciences*, 132(3), 171-180.
- Zhang, S. L., Kozak, J. A., Jiang, W., Yeromin, A. V., Chan, J., ... Cahalan, M. D. (2008). Store-dependent and -independent modes regulating Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity of human Orai1 and Orai3. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(25), 17662-17671.
- Zheng, L., Stathopulos, P. B., Li, G.-Y., & Ikura M. (2008). Biophysical characterization of the EF-hand and SAM domain containing Ca²⁺ sensory region of STIM1 and STIM2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369(1), 240-246.